



Implication de l'unfolded protein response et de l'autophagie dans la morphogénèse du rotavirus.

Lan Trang Vu

► To cite this version:

Lan Trang Vu. Implication de l'unfolded protein response et de l'autophagie dans la morphogénèse du rotavirus.. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066492 . tel-01249401

HAL Id: tel-01249401

<https://theses.hal.science/tel-01249401>

Submitted on 4 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT

Présentée à

l'Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale : Complexité du Vivant (ED 515)

Par **Lan-Trang VU**

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Spécialité : Biologie Cellulaire - Virologie

Sujet de thèse :

Implication de l'*Unfolded Protein Response* et de l'autophagie dans la morphogénèse du rotavirus

Directeur de recherche : Germain TRUGNAN

Soutenue le 18 décembre 2014

Devant le jury composé de :

M. Oscar BURRONE, *PI, ICGEB, Italy*

M. Mathias FAURE, *PU, Université Lyon 1*

M. Bruno GOUD, *DR, Institut Curie*

M. Patrice CODOGNO, *DR, Université Paris Descartes*

M. Eric CHEVET, *DR, Université Bordeaux Ségalen*

M. Germain TRUGNAN, *PU-PH, Université Pierre et Marie Curie*

M. Serge CHWETZOFF, *CR, Université Pierre et Marie Curie*

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Invité

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les Professeurs Germain Trugnan et Philippe Seksik de m'avoir accueillie au sein de leur équipe de recherche.

Merci infiniment au Professeur Germain Trugnan, mon directeur de thèse. Merci de m'avoir transmis toutes ces connaissances et surtout toute cette passion. Merci de m'avoir toujours poussée à aller plus loin que mes limites, et de toujours avoir été présent pour me soutenir. C'est grâce à cet encouragement et ce soutien constant qu'au cours de ces trois années de thèse, malgré les moments de doute, de frustration, de découragement, je n'ai jamais cessé, ou jamais pu cesser, d'avancer.

Merci au Docteur Serge Chwetzoff, mon co-directeur de thèse, pour son encadrement scientifique, pour sa disponibilité dès que le moindre problème se pose, pour ses critiques qu'il appelle « rabat-joie » mais qui, justement, m'ont appris la rigueur scientifique.

*_*_*_*_*_*

Je remercie chaleureusement les membres du jury.

Le Professeur Mathias Faure et le Docteur Oscar Burrone, qui ont aimablement accepté d'être rapporteurs de ma thèse, malgré leurs nombreuses charges professionnelles.

Le Docteur Bruno Goud et le Docteur Eric Chevet, qui ont accepté d'examiner mon travail.

Le Docteur Patrice Codogno, qui a participé aux différents comités de thèse et m'a fait bénéficier de ses nombreux conseils dans le domaine de l'autophagie, et qui, pour ma soutenance de thèse, a accepté d'être examinateur.

*_*_*_*_*_*

Merci à Ginette Thomas qui m'a encadrée lors de mes tout premiers pas dans le métier, lorsque j'étais encore une étudiante de licence, et qui est devenue pendant ces années de thèse, ma « maman du labo ».

Merci à Sarah Duponchel pour avoir partagé avec moi d'innombrables souvenirs de la thèse, ces milles et unes histoires immortalisées par tous ces post-it que je garde soigneusement, et cette amitié que je chéris. Merci pour cette correction très minutieuse de mon manuscrit, même à distance et à la dernière minute.

*_*_*_*_*_*

Merci à Antoine Garbarg-Chenon pour tous ses conseils et sa disponibilité à chaque question de « viro » ou de « Mac ». Merci à Aurélie Schnuriger pour son aide et son soutien.

Merci à Claire McQuitty pour son aide tant technique que linguistique, et pour ces moments qui ont égayé la période d'écriture. Merci à Sophie Ancel pour le joyeux sourire qu'elle apporte aux expériences.

**_*_*_

Un immense et chaleureux merci à tous les membres du laboratoire ERL INSERM U1157.

Merci à Joëlle Masliah pour son soutien pendant toute ma thèse et particulièrement pendant la dernière ligne droite.

Merci à Marie-Anne Maubert pour son acharnement sur nos expériences même quand les premiers résultats étaient décourageants. Merci pour sa gentillesse, pour sa présence rassurante et motivante tard le soir quand les couloirs se vident.

Merci à Elodie Quévrain pour son soutien technique, son écoute et aussi pour les courses à pieds du jeudi, qui ont réussi à améliorer mes capacités sportives même en période d'écriture.

Merci à Antonin Lamazière, Dominique Rainteau, Jean-Pierre Grill, Lydie Humbert et Harry Sokol.

Merci à nos gestionnaires Valérica Mandrea, Kim Girard Dao et Chaffia Dordoigne. Merci à Kim pour son aide dans tout genre de soucis administratifs, à tout moment, au bureau ou à distance, et pour son soutien sans arrêt.

Merci à Anne-Sophie Bernard, Cécilia Landman, Sarah Dib, My-Linh Tran-Minh, Mélanie Clément, Valentin Leduc, Lucas Henry, Emilie Mathieu, Bruno Lamas, Ludmia Taibi pour ces joyeux moments partagés dans « la cuisine » qui ont allégé les journées bien remplies.

Merci à Loïc Brot pour sa disponibilité et pour toutes les commandes passées dans l'immédiat pendant les derniers mois de la thèse où tout était urgent. Merci à Lucette Groisard qui est toujours prête à m'aider et à faire des petites blagues pour m'encourager.

Merci à Sarah Layani, Virginie Grondin et Nathalie Courroussé.

**_*_*_

Merci à Marie-Christine et Léo Ruiz, à Fabian et Maruja Michelangeli pour les expériences scientifiques et culturelles au Venezuela. Merci à Marie-Christine pour tous les encouragements. Merci à Reinaldo Zavala, Carolina Aristimuño, Andrea Prieto, Franshelle Peña et José Bustamante et pour leur amitié et soutien même à distance, qui ont rendu les semaines passées au Venezuela bien plus qu'un échange scientifique.

*_*_*_*_*_*

*Un tendre merci à mes parents qui m'ont fait confiance il y a huit ans quand j'ai pris la grande décision de partir étudier en France, **quand tout a commencé...** Merci à ma famille pour m'avoir sans cesse encouragée et enveloppée de tendresse, même à des centaines de milliers de kilomètres loin de moi.*

Merci à Sebastian Lechner, le « directeur artistique » du manuscrit et le compagnon dans mes projets professionnels et projets de vie à venir.

Liste des abréviations

[Ca ²⁺ (cyto)]	concentration cytoplasmique en Ca ²⁺
AcbA	Acyl coenzyme A binding protein
AMPK	AMP-activated protein kinase
ARN (+)	ARN à polarité positive
ARN (-)	ARN à polarité négative
ARNdb	ARN double brin
ARNsb	ARN simple brin
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
ATG	AuTophagy-related protein
bZip	basic leucine zipper
CaMKKβ	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent kinase kinase-β
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CHOP	C/EBP homologous protein
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNX	Calnexine membranaire
COPII	Coat Protein complex II
CRpP	Constitutive Repressor of eIF2α Phosphorylation
CRT	Calréticuline
DPP IV	dipeptidyl peptidase IV
DFCP1	Double FYVE-Containing Protein 1
DLP	particule à double couche
DMV	vésicules à double membrane
EDEM	ER Degradation-Enhancing α1,2-Mannosidase-like
eIF2α	Sous unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2
eIF4G	Facteur d'initiation de la traduction
ER-ManI	ER α1,2-Mannosidase I
ERAD	ER-associated degradation
ERdj	ER-localized DnaJ proteins
ERES	ER exit sites
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
ERGIC53	ER-Golgi intermediate compartment 53
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ERQC	ER Quality Control
ERSE	ER stress response element
FGF-1	Fibroblast Growth Factor-1
FIP200	Focal adhesion kinase family Interacting Protein of 200 kDa
FKBP	FK506-binding proteins
GABARAP	GABA Receptor-Associated Protein
GAD	GRASP and Autophagy-Dependent
GADD34	Growth arrest and DNA damage-inducible gene 34
GADD153	Growth arrest and DNA damage-inducible gene 153
GATE-16	Golgi-associated ATPase Enhancer of 16kDa
GEA	Gastro-entérites aigües
GI et GII	Glucosidase I et II
GRASP	Golgi Re-assembly and Stacking Protein
GRP	Glucose-related protein
GT	UDP-glucose-Glycoprotein Glucosyl Transferase
HCV	Virus de l'hépatite C humain
HMGB1	High Mobility Group Box 1 protein
HRD1	HMG-CoA Reductase Degradation protein 1
Hsp	Heat shock protein

IFN	Interféron
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LAMP	Lysosomal-Associated Membranes Proteins
LC3	Microtubules-associated protein-light chain 3
LIR	LC3-interacting region
LKB1	Liver kinase B1
MAM	Mitochondria-Associated Membranes
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mTORC1	Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
MVB	Corps multivésiculaires
NBR1	Neighbor of BRCA1 gene
NEF	Nucleotide Exchange Factors
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
Nrf2	NF-E2-related factor 2
NSP	Protéine non structurale
OS9	Osteosarcoma amplified 9
OST	Oligosaccharyl Transferase
p38 ^{MAPK}	p38 mitogen-activated protein kinase
P-eIF2 α	eIF2 α phosphorylé
PABP	PolyA-Binding Protein
PDI	Protein Disulfide Isomerases
PDZ	Domaine PSD95/Dlg1/ZO-1
PE	Phosphatidyl-éthanolamine
PERK	PKR-like ER kinase
PFU	Plate forming unit
PI3P	Phosphatidyl-Inositol-3-phosphate
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKR	Protein Kinase R
PPI	Peptidyl Prolyl cis-trans Isomerases
PP1C	Protein phosphatase 1C
RE	Réticulum Endoplasmique
REL	RE lisse
RER	RE rugueux
RIDD	IRE1-dependent mRNA decay
S1P	Site-1 protease
S2P	Site-2 protease
SEL1L	Sel-1 suppressor of lin-12-like
SI	Saccharase-isomaltase
SLP	Particule simple couche
SQSTM1	Séquestosome 1
SV40	Virus simien 40
TGN	Réseau trans-golgien
TLP	Particule à triple couche
TLR	Toll-like receptors
TSC1/2	Tuberous Sclerosis Complex 1/2
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
UBA	Domaine ubiquitin-associated
ULK1/2	Unc-51-like kinase 1/2
UPR	Unfolded Protein Response
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine
VIP36	Vesicular integral membrane protein 36
VIPL	VIP36-like protein
VP	Protéine structurale
VSV	Virus de la Stomatite Vésiculaire

WIPI	WD-repeat protein Interacting with PhosphoInositides
XPB1	X-box binding protein-1
XTP3B	XTP3-transactivated gene B protein

Liste des Figures

Figure 1. Représentation schématique de l'énergie libre de l'ensemble des conformations adoptées par une protéine au cours de son repliement

Figure 2. Structure et fonctionnement des chaperonnes de la famille Hsp70

Figure 3. Modifications des chaînes N-glycaniques des glycoprotéines dans le RE

Figure 4. Contrôle qualité des protéines dans le RE

Figure 5. Concentration des cargos dans les vésicules COPII

Figure 6 : Organisation du complexe de rétro-translocation autour de son substrat, exemple du complexe HRD1

Figure 7. Visualisation par microscopie électronique d'un autophagosome contenant des portions du RE

Figure 8. Modèle des différentes voies de dégradation des protéines du RE

Figure 9. Modèle de compartimentation du RE

Figure 10. Organisation de la voie sécrétoire conventionnelle

Figure 11. Différentes voies de sécrétion des protéines

Figure 12. Modèle d'arrimage de deux membranes grâce à la trans-oligomérisation de GRASP

Figure 13. Modèles proposés pour l'activation d'IRE1

Figure 14. Les trois voies de l'UPR

Figure 15. Régulation de la phosphorylation d'eIF2 α au cours de l'UPR

Figure 16. Différentes phases de l'UPR : adaptation–transition–apoptose

Figure 17. Inhibiteurs pharmacologiques spécifiques d'IRE1 ou de PERK

Figure 18. Différents types d'autophagie

Figure 19. Autophagie sélective dépendant de p62 (ou de NBR1)

Figure 20. Modèle de formation de l'autophagosome à partir de la membrane du RE

Figure 21. Deux systèmes de conjugaison ubiquitine-like impliqués dans la formation de l'autophagosome

Figure 22. Modèle d'action du complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 dans la lipidation de LC3 au niveau de la membrane du phagophore

Figure 23. Apports membranaires pour l'élongation du phagophore

Figure 24. Voies de signalisation régulant l'autophagie

Figure 25. Induction de l'autophagie lors du stress du RE

Figure 26. Répartition géographique de la mortalité infantile due à l'infection par le rotavirus avant l'introduction du programme de vaccination à l'échelle mondiale (données de 2008)

Figure 27. Tropisme du rotavirus pour les entérocytes matures de l'épithélium intestinal

Fig 28. Structure du rotavirus

Figure 29. Cycle réplcatif du rotavirus

Figure 30. Similarité fonctionnelle entre la protéine virale NSP3 et la protéine cellulaire PABP

Figure 31. Modèle d'assemblage des DLP dans les viroplasmes

Figure 32. Localisation d'EDEM1 dans les cellules Caco-2 non différenciées infectées par le rotavirus

Figure 33. Localisation de GRASP55 dans les cellules Caco-2 différenciées infectées par le rotavirus

Liste des Tableaux

Tableau 1. Principaux membres de la machinerie de repliement, de contrôle qualité et de dégradation des protéines dans le RE.

Tableau 2. Liste non exhaustive de cargos sécrétés de manière non conventionnelle

Table des matières

Remerciements.....	2
PROBLEMATIQUE DE LA THESE ET PLAN DU MANUSCRIT.....	12
INTRODUCTION	15
Chapitre I : Repliement et contrôle qualité des protéines dans le RE	16
1.1. Le repliement des protéines	16
1.1.1. BiP/GRP78, ses co-chaperonnes et l'endoplasmine/GRP94	19
1.1.2. Les lectines CNX et CRT	20
1.1.3. Les PDI et les PPI	21
1.2. Contrôle qualité des protéines.....	22
1.2.1. Système de contrôle qualité basé sur le « code glycan ».....	23
1.2.2. Système de contrôle qualité basé sur BiP	26
1.3. Exportation des protéines correctement repliées vers l'appareil de Golgi.....	27
1.4. Dégradation des protéines	29
1.4.1. Voie ERAD	29
1.4.2. Voie impliquant la réticulophagie	31
1.4.3. Voie impliquant les vésicules EDEM	34
1.5. Compartimentation du RE	34
1.5.1. ER exit sites (ERES)	35
1.5.2. Sous-compartiment de dégradation par la voie ERAD.....	36
1.5.3. Régulation d'ERAD (<i>ERAD tuning</i>)	36
Chapitre II : Sécrétion des protéines : voie conventionnelle <i>versus</i> voies non conventionnelles .	38
2.1. Voie de sécrétion conventionnelle	38
2.2. Voies de sécrétion non conventionnelles.....	40
2.2.1. Différentes voies de sécrétion non conventionnelles	41
2.2.2. Implication de la machinerie autophagique dans la sécrétion non conventionnelle...	44
2.2.3. Implication des protéines GRASP dans la sécrétion non conventionnelle	44
Chapitre III : Stress du RE et UPR.....	47
3.1. Détection du stress du RE par IRE1, PERK et ATF6	47
3.1.1. Activation d'IRE1 et de PERK.....	48
3.1.2. Activation d'ATF6.....	50
3.2. Signalisation initiée par les trois voies de l'UPR.....	51
3.2.1 Voie IRE1	51
3.2.2. Voie PERK	53
3.2.3. Voie ATF6.....	56
3.3. Impacts fonctionnels de l'UPR	56
3.3.1. Diminution de la charge protéique entrant dans le RE.....	56
3.3.2. Renforcement de la machinerie de repliement et de contrôle qualité des protéines dans le RE	56

3.3.3. Augmentation de la dégradation des protéines mal/non repliées par la voie ERAD ..	57
3.3.4. Dégradation des portions du RE par l'autophagie	57
3.3.5. Influence sur le devenir de la cellule : survie ou apoptose.....	58
3.4. Modulation de l'UPR par les virus.....	59
3.5. Modulation de l'UPR par les drogues chimiques	60
Chapitre IV : Autophagie	63
4.1. Différents types d'autophagie	63
4.1.1. Autophagie médiée par les chaperonnes, microautophagie et macroautophagie	63
4.1.2. Autophagie non sélective <i>versus</i> autophagie sélective.....	64
4.2. Machinerie autophagique	66
4.2.1. Nucléation du phagophore.....	66
4.2.2. Elongation du phagophore en autophagosome : deux systèmes de conjugaison <i>ubiquitin-like</i>	68
4.2.3. Apports membranaires pour la formation de l'autophagosome	72
4.2.4. Etapes tardives de l'autophagie	73
4.2.5. Mécanismes alternatifs de formation des autophagosomes.....	74
4.3. Voies de signalisation régulant l'autophagie.....	74
4.3.1. Activation de mTORC1 par les facteurs de croissance et les acides aminés.....	75
4.3.2. Inhibition de mTORC1 par AMPK.....	76
4.3.3. Régulation de l'interaction entre Beclin-1 et Bcl-2.....	77
4.3.4. Induction de l'autophagie par le stress du RE.....	77
4.4. Modulation de l'autophagie par les virus.....	78
Chapitre V : Rotavirus.....	80
5.1. Physiopathologie du rotavirus.....	80
5.1.1. Importance médicale du rotavirus.....	80
5.1.2. Tropisme cellulaire et physiopathologie des diarrhées dues aux rotavirus.....	81
5.2. Génome et structure du rotavirus.....	83
5.2.1. Génome viral.....	83
5.2.2. Structure des virions.....	83
5.3. Modèles cellulaires pour étudier le rotavirus	85
5.4. Cycle réplcatif du rotavirus.....	85
5.4.1. Entrée et décapsidation partielle	86
5.4.2. Synthèse et traduction des ARNm viraux	87
5.4.3. Réplication du génome et début d'assemblage des virions (jusqu'au stade DLP)	89
5.4.4. Bourgeonnement des DLP dans le RE et acquisition de VP7.....	90
5.4.5. Acquisition de la protéine de spicule VP4 : deux modèles contradictoires	92
5.4.6. Sortie des virions de la cellule hôte : sortie lytique <i>versus</i> non lytique	94
5.4.7. Rôle de la concentration cytoplasmique en Ca ²⁺ dans la morphogénèse virale.....	96
5.5. Modulation de l'UPR et de l'autophagie par le rotavirus.....	96

5.5.1. Rotavirus et UPR.....	96
5.5.2. Rotavirus et autophagie.....	97
OBJECTIFS ET STRATEGIES DU TRAVAIL.....	99
RESULTATS.....	100
Chapitre I :.....	101
1. Résumé des résultats.....	101
2. Manuscrit.....	102
Chapitre II :	142
1. Résumé des résultats.....	142
2. Manuscrit.....	143
Chapitre III :	175
1. EDEM1 co-localise avec les composants des viroplasmes.....	175
2. L'infection par le rotavirus induit la désorganisation de GRASP55.....	179
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	181
1. L'UPR dans la morphogénèse du rotavirus.....	182
1.1. Activation et modulation de l'UPR par le rotavirus.....	182
1.2. Rôle fonctionnel des voies IRE1 et PERK dans la morphogénèse du rotavirus	183
2. L'autophagie dans la morphogénèse du rotavirus	185
2.1. Changement du statut autophagique des cellules Caco-2 au cours de la différenciation	185
2.2. L'infection à rotavirus bloque la formation et la maturation des autophagosomes.....	186
2.3. L'infection à rotavirus induit une lipidation de LC3 non reliée à l'autophagie, uniquement dans les cellules Caco-2 non différenciées	187
2.4. La lipidation de LC3 induite par le rotavirus dans les cellules Caco-2 non différenciées est corrélée avec l'apparition de formes clivées d'ATG3.....	188
2.5. Ni l'autophagie, ni la lipidation de LC3 induite par le rotavirus, ne sont impliquées dans la morphogénèse virale.....	188
3. Potentielle implication de EDEM1 dans la morphogénèse du rotavirus	190
4. Potentielle implication des protéines GRASP dans le trafic intracellulaire du rotavirus	190
5. Conclusions et perspectives de recherche	191
5.1. Caractérisation du rôle des acteurs de la voie ERAD dans la sortie du RE du rotavirus	192
5.2. Caractérisation du mécanisme de lipidation de LC3 induite par l'infection à rotavirus dans les cellules Caco-2 non différenciées.....	192
5.3. Caractérisation de l'autophagie au cours de la différenciation des cellules Caco-2.....	193
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	194
ANNEXES.....	217

PROBLEMATIQUE DE LA THESE ET PLAN DU MANUSCRIT

Les virus ont très tôt été utilisés comme outils originaux et performants pour explorer de nouveaux champs de la biologie des cellules eucaryotes. Ainsi, c'est grâce à l'observation du bourgeonnement basolatéral du Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV) et du bourgeonnement apical du virus Influenza que les premières données sur le trafic polarisé dans les cellules eucaryotes ont vu le jour (Rodriguez Boulan and Sabatini, 1978). Le rotavirus, agent étiologique majeur des gastro-entérites aiguës chez les jeunes enfants et les jeunes animaux, semble présenter des potentialités tout aussi intéressantes que VSV ou Influenza pour élucider, cette fois, de nouvelles voies de trafic atypiques. En effet, ce virus possède une morphogénèse originale : il s'agit d'un virus nu qui s'assemble dans des usines virales, les viroplasmes, puis dans le réticulum endoplasmique (RE). Les virions sont ensuite relargués de manière polarisée au niveau du pôle apical des entérocytes selon une voie de trafic qui ne passe pas par l'appareil de Golgi, pourtant reconnu comme organite central du tri polarisé des protéines. Bien que de très nombreux travaux aient été consacrés à ce virus (connaissances exhaustives de ses gènes, de sa structure ou de l'immunologie du virus), son assemblage et son trafic restent bien mystérieux. L'une des raisons de ce constat réside probablement dans le fait que la plupart des études réalisées, l'ont été dans des modèles cellulaires qui n'ont que des ressemblances lointaines avec l'entérocyte, la cible privilégiée du rotavirus.

Mon travail de thèse s'inscrit directement dans cette problématique : étudier l'assemblage et le trafic polarisé du rotavirus dans des cellules entérocytaires, et plus spécifiquement tenter de répondre à deux questions : (1) comment les virions sortent du RE au cours du processus d'assemblage et (2) par quelle voie de trafic atteignent-ils la membrane apicale des entérocytes sans passer par l'appareil de Golgi ? Pour tenter d'y répondre, j'ai étudié deux processus cellulaires : l'*Unfolded Protein Response* (UPR) et la macro-autophagie, au cours de l'infection à rotavirus.

(1) L'UPR, comme son nom l'indique, est la réponse cellulaire spécifique face à une perturbation du repliement des protéines dans le RE, condition appelée « stress du RE ». Le RE est doté d'une machinerie complexe qui procède au repliement des protéines de la voie sécrétoire, contrôle leur qualité, adresse les protéines correctement repliées vers l'appareil de Golgi ou au contraire celles définitivement mal/non repliées vers la dégradation. Lors du stress du RE, la mise en place de l'UPR permet de renforcer cette machinerie. Les interactions d'une protéine avec la machinerie de repliement et de contrôle qualité dans le RE

conditionnent son devenir. Si elle est identifiée comme protéine à dégrader, elle sera extraite du RE et dégradée dans le protéasome ou dans les lysosomes. Ainsi, les mécanismes de dégradation des protéines du RE représentent des voies de sortie de ce compartiment, différentes de celle dirigée vers l'appareil de Golgi.

(2) La macroautophagie, par la suite désignée par autophagie, permet la séquestration de portions du cytoplasme dans des vésicules à double membrane, les autophagosomes, qui vont fusionner avec les lysosomes et y déverser leur contenu. Elle constitue l'un des mécanismes de dégradation des protéines du RE, en séquestrant et dégradant les protéines ayant été extraites du RE ou des portions du RE lui-même. De manière intéressante, l'autophagie, de par la mobilisation et le remaniement des membranes intracellulaires qu'elle induit, a été récemment impliquée dans des voies de sécrétion non conventionnelles qui ne passent pas par l'appareil de Golgi.

Mes travaux de thèse visent donc à étudier les étapes d'assemblage intra et post-réticulaires du rotavirus. La problématique sera présentée dans les 5 chapitres de la section **INTRODUCTION**, organisée de façon suivante :

- Le chapitre I abordera la machinerie de repliement et de contrôle qualité des protéines dans le RE, en portant une attention particulière aux voies de sortie du RE
- Le chapitre II discutera des voies de sécrétion non conventionnelles
- Le chapitre III présentera le stress du RE, l'UPR et ses impacts fonctionnels sur le RE
- Le chapitre IV traitera de l'autophagie en privilégiant l'aspect mécanistique de ce processus
- Enfin, le chapitre V, dédié au rotavirus, insistera sur les traits atypiques de sa morphogénèse.

Après avoir récapitulé les objectifs de la thèse et défini les stratégies de travail, je présenterai les données obtenues dans la section **RESULTATS**, qui sera organisée en 3 chapitres :

- Le chapitre I portera sur les relations du stress du RE et de l'UPR avec l'infection à rotavirus et sera présenté sous forme d'un manuscrit actuellement soumis pour publication
- Le chapitre II traitera des interactions du rotavirus avec la machinerie autophagique et sera aussi présenté sous forme d'un manuscrit en cours de soumission.

- Le chapitre III présentera les résultats complémentaires ne figurant pas dans les deux manuscrits des chapitres I et II.

Enfin, dans la section **DISCUSSION et PERSPECTIVES**, je discuterai de l'ensemble des résultats afin de les replacer dans le contexte global de la problématique et je proposerai des perspectives de recherches.

Les **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** ainsi qu'un document **ANNEXE** (publication sur le sujet de génétique inverse du rotavirus) clôtureront ce manuscrit.

INTRODUCTION

Chapitre I : Repliement et contrôle qualité des protéines dans le RE

Le RE est le lieu de biosynthèse et de repliement d'un ensemble de protéines qui comprend : (i) des protéines résidentes des compartiments de la voie sécrétoire (RE, *ER-Golgi intermediate compartment* (ERGIC), appareil de Golgi, réseau trans-golgien) ; (ii) l'essentiel des protéines des compartiments endo-lysosomaux ; (iii) des protéines intégrales de la membrane plasmique et (iv) des protéines sécrétées. Ces protéines possèdent un peptide signal à l'extrémité N-terminale qui permet leur translocation co-translationnelle dans le RE. Elles sont regroupées sous le terme général de « protéines de la voie sécrétoire conventionnelle ». Nous verrons par la suite qu'il existe d'autres voies de sécrétion, dite non conventionnelles, qui concernent, sauf exception, des protéines dépourvues de peptide signal (*cf* chapitre II p38).

Le RE possède une machinerie complexe composée notamment de chaperonnes moléculaires, de lectines et d'enzymes qui aident au repliement et procèdent au contrôle qualité des protéines. Les protéines correctement repliées/assemblées seront exportées vers l'appareil de Golgi, ou, lorsqu'il s'agit de protéines résidentes du RE, maintenues ou rapatriées dans ce compartiment. Au contraire, les protéines mal/non repliées et les sous-unités protéiques non assemblées, dont l'accumulation dans le RE peut être toxique pour la cellule, seront extraites du RE et dégradées dans le cytoplasme. Ces observations sous-entendent que le RE est capable de reconnaître et de séparer physiquement, grâce à la compartimentation du RE, des protéines présentant différents états de repliement.

1.1. Le repliement des protéines

Le repliement d'une chaîne polypeptidique en une structure tridimensionnelle unique est un processus au cours duquel la chaîne polypeptidique « teste » de manière stochastique un ensemble de conformations jusqu'à ce qu'elle atteigne la conformation native (Dobson, 2003). Cette dernière est définie comme la conformation thermodynamiquement la plus stable dans les conditions physiologiques, c'est-à-dire celle qui possède le niveau d'énergie libre le plus bas (**Fig 1**). Le repliement d'une protéine est dirigé par des interactions covalentes telles que les liaisons peptidiques et les ponts disulfures, ainsi qu'un ensemble de liaisons non covalentes telles que les liaisons hydrogènes, les interactions électrostatiques, les forces de Van der Waals et les interactions hydrophobes. Outre l'influence du squelette carboné lui-même, le repliement d'une protéine est dicté majoritairement par les interactions hydrophobes. En effet, elles orientent le repliement des protéines vers les conformations dans

lesquelles les résidus hydrophobes sont enfouis à l'intérieur tandis que les résidus hydrophiles sont exposés à la surface, ce qui stabilise les protéines dans l'environnement intracellulaire aqueux.

Par ailleurs, une caractéristique des protéines dans le RE est que la plupart d'entre elles sont glycosylées sur un résidu Asn d'une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (processus de N-glycosylation, N étant le code à une lettre de l'Asn) (Chavan and Lennarz, 2006). De par leur caractère hydrophile, les chaînes N-glycaniques favorisent les repliements qui les exposent à la surface des glycoprotéines. De ce fait, la N-glycosylation fait partie intégrante du processus de repliement.

Si théoriquement les informations contenues dans la chaîne polypeptidique sont suffisantes au repliement d'une protéine, les contraintes biologiques *in vivo* imposent cependant que le repliement soit aidé par une machinerie de protéines spécifiques, les chaperonnes moléculaires et les enzymes de repliement (foldases).

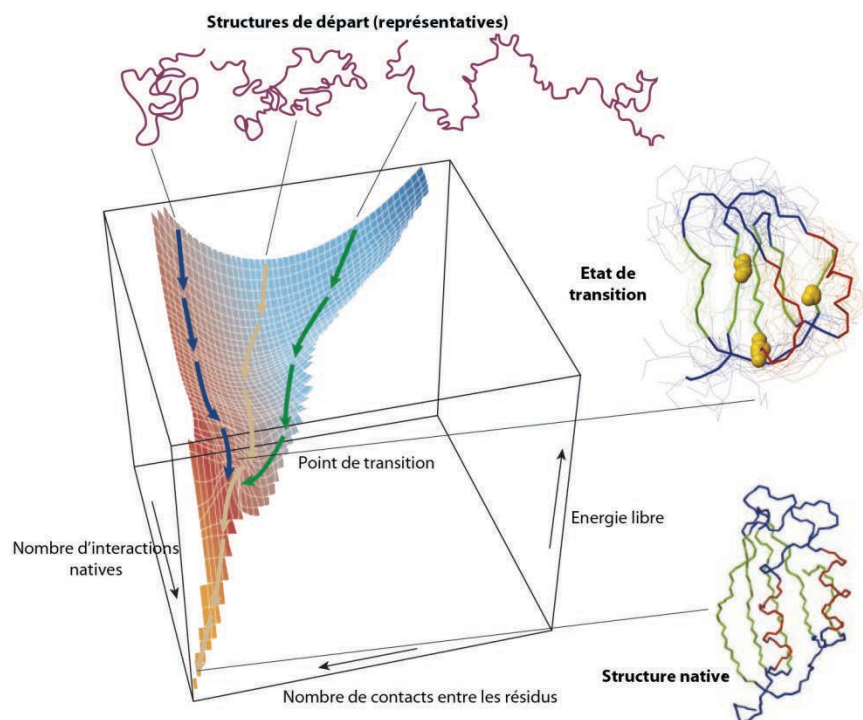


Figure 1. Représentation schématique de l'énergie libre de l'ensemble des conformations adoptées par une protéine au cours de son repliement (adapté de Dobson, 2003)

Les différentes conformations non natives sont situées en haut de « l'entonnoir énergétique de repliement ». L'unique conformation native, définie comme conformation ayant l'énergie libre la plus basse, est située au fond de « l'entonnoir ». Le point de transition représente la barrière énergétique à franchir au cours du repliement vers la structure native.

Deux réseaux de chaperonnes moléculaires existent dans le RE (Gidalevitz et al., 2013) (voir **Tableau 1**). Le premier réseau est constitué des *Glucose-Related Proteins* (GRP), GRP78/BiP et GRP94/Endoplasmine, qui sont les représentants réticulaires des familles des *Heat Shock Protein* (Hsp) 70 et Hsp90, respectivement. Le deuxième réseau est composé de chaperonnes spécifiques des glycoprotéines, des lectines à activité chaperonne : la Calnexine (CNX) membranaire et son homologue soluble, la Calréticuline (CRT). Les chaperonnes interagissent de manière non covalente et transitoire avec les protéines en cours de repliement grâce à la reconnaissance de séquences ou motifs spécifiques (séquences hydrophobes pour BiP ou chaînes N-glycaniques pour CNX/CRT) (Flynn et al., 1991; Vassilakos et al., 1998). Ces interactions aident au repliement des protéines, d'une part en réduisant leur espace de repliement et donc le nombre de conformations potentielles, d'autre part en favorisant certaines conformations plus que d'autres, favorisant ainsi l'acquisition par les protéines d'une conformation native (Gidalevitz et al., 2013). Par exemple, la liaison de BiP aux séquences hydrophobes sur les protéines en cours de repliement retarde l'enfouissement de ces dernières afin que le repliement local soit coordonné avec le repliement général de la protéine, conduisant à la structure native. La liaison de CNX/CRT aux glycoprotéines réduit la liberté conformationnelle du squelette carboné à proximité des chaînes glycaniques, de telle sorte que les acides aminés hydrophobes proches des chaînes glycaniques se retrouvent avec celle-ci à la surface de la protéine. Par ailleurs, la liaison des chaperonnes empêche l'agrégation des protéines en cours de repliement.

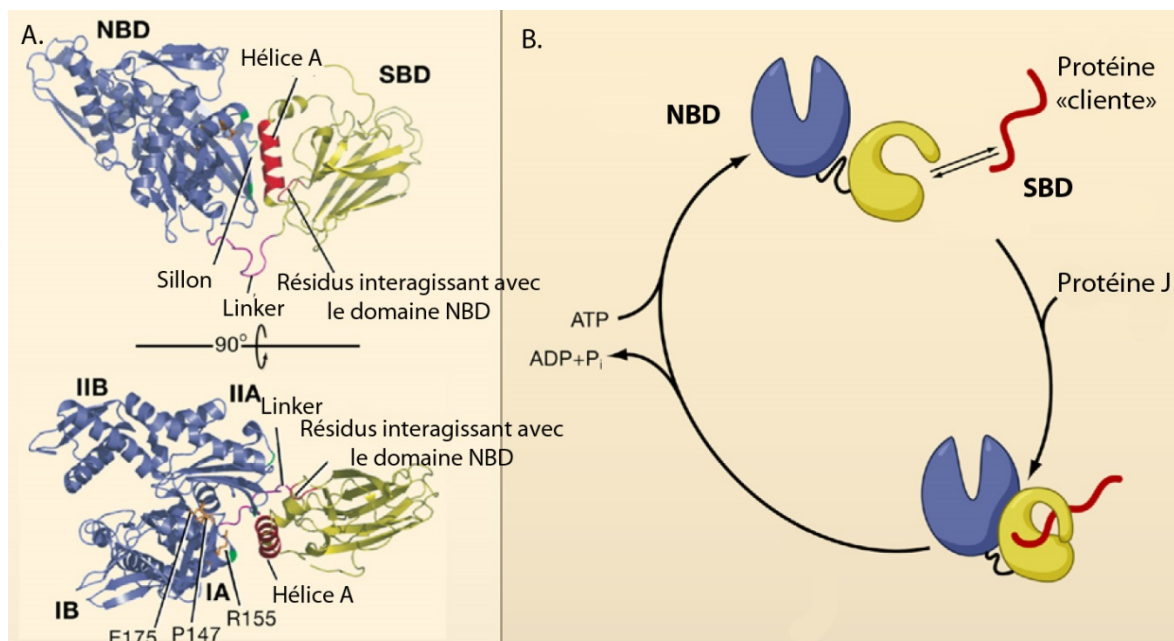
A la différence des chaperonnes, les enzymes de repliement modifient leur substrats de manière covalente. Les *Peptidyl Prolyl cis-trans Isomerases* (PPI) isomérisent la liaison peptidique précédant une proline (liaison peptidyl-prolyl) et les *Protein Disulfide Isomerases* (PDI) catalysent la formation de ponts disulfures, réaction adaptée à l'environnement oxydant du RE (Gidalevitz et al., 2013). Non seulement ces modifications covalentes stabilisent les intermédiaires de repliement, mais elles contribuent également à dicter le repliement de la protéine, en imposant des contraintes structurales.

Dans la partie qui suit, les différents acteurs du repliement des protéines seront présentés. Il est à noter que la plupart de ces acteurs participent également au contrôle qualité des protéines, ce qui fait que ces deux processus sont étroitement liés et concomitants. Cependant, pour des raisons de clarté, je décrirai tout d'abord le repliement des protéines, puis je présenterai ultérieurement le contrôle qualité.

1.1.1. BiP/GRP78, ses co-chaperonnes et l'endoplasmine/GRP94

BiP/GRP78

La chaperonne BiP est une protéine essentielle et sa délétion est létale aux stades embryonnaires précoces (Luo et al., 2006). BiP possède un domaine à activité ATPase en N-terminal et un domaine de liaison aux peptides en C-terminale (Bukau et al., 2006) (**Fig 2A**). La reconnaissance par BiP de séquences de 7 à 11 acides aminés dont la majorité sont hydrophobes lui confère un large spectre de protéines « clientes » (Flynn et al., 1991; Blond-Elguindi et al., 1993). L'association et le détachement de BiP de ces dernières dépendent de son cycle d'hydrolyse de l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP stabilise la liaison de BiP aux peptides, tandis que l'échange de l'ADP contre l'ATP favorise son détachement (**Fig 2B**) (Mayer and Bukau, 2005).



Les co-chaperonnes de BiP : les ERdj

L'activité ATPase de BiP nécessite une stimulation par des cofacteurs. Ces derniers agissent comme des co-chaperonnes. Ils appartiennent à la famille des Hsp40 et possèdent un domaine J qui permet leur interaction avec les Hsp70, d'où leur autre nom « protéines J » (Awad et al., 2008). Dans le RE, ces co-chaperonnes de BiP sont au nombre de sept et sont nommées *ER-localized DnaJ proteins* (ERdj) 1 à 7. Elles modulent les différentes fonctions de BiP : translocation co-traductionnelle des peptides (ERdj1 et 2), repliement (ERdj1, 2, 3 et 6) et rétro-translocation de protéines destinées à la dégradation (ERdj4 et 5). Les fonctions de ERdj7 sont encore mal comprises (Otero et al., 2010).

L'échange de l'ADP contre l'ATP est réalisé par des *Nucleotide Exchange Factors* (NEF) comme Bap/Sil1 (Shomura et al., 2005) ou Grp170 (Dragovic et al., 2006). L'équilibre entre les ERdj et les NEF serait important pour réguler l'activité chaperonne de BiP du moins sur certaines protéines « clientes » (Zhao et al., 2010).

Endoplasmine/GRP94

GRP94 est le seul représentant de la famille des Hsp90 dans le RE. Le spectre de protéines « clientes » de GRP94 est plus restreint que celui de BiP, et toutes les protéines ne nécessitent pas l'activité chaperonne de GRP94 (Eletto et al., 2010). Aucune séquence ou motif structural n'a été identifié comme élément consensus reconnu par GRP94. Dans le processus de repliement des protéines, GRP94 agirait après BiP en se liant aux intermédiaires de repliement plus avancés (Eletto et al., 2010), ce qui rappelle la séquence d'action des Hsp70 et Hsp90 dans le cytoplasme (Wegele et al., 2006). La coordination fonctionnelle de GRP94 et de BiP est soulignée par le fait que quand l'une des deux chaperonnes est absente génétiquement ou inactivée par des moyens pharmacologiques, l'autre est up-régulée (Eletto et al., 2012).

Comme BiP, le fonctionnement de GRP94 dépend des cycles d'hydrolyse de l'ATP (Ostrovsky et al., 2009), cependant aucun cofacteur accélérant l'activité ATPase, ni aucun NEF n'a été identifié pour GRP94.

1.1.2. Les lectines CNX et CRT

La CNX, une protéine transmembranaire et son homologue soluble CRT sont des lectines intra-réticulaires qui se lient aux chaînes glycaniques polymannoses des N-glycoprotéines lorsque les deux glucoses périphériques ont été clivés par les enzymes Glucosidases I et II (GI et GII) (Vassilakos et al., 1998) (**Fig 3**) (cf §1.2.1 p23). CNX se lie

plutôt aux glycoprotéines transmembranaires, tandis que CRT se lie préférentiellement aux glycoprotéines solubles (Wada et al., 1995). CNX/CRT sont impliquées dans le repliement des glycoprotéines à la fois directement en tant que chaperonnes, et indirectement en recrutant ERp57, une enzyme de la famille des PDI qui catalyse la formation de ponts disulfures (Oliver et al., 1999).

1.1.3. Les PDI et les PPI

La famille des PDI, dont les principaux membres sont présentés dans le **Tableau 1**, est composée d'oxydoréductases qui catalysent l'oxydation des groupements thiols des cystéines (formation de ponts disulfure), leur réduction (coupure) ou leur isomérisation (réarrangement) (Oka and Bulleid, 2013). La déficience de l'un des membres de cette vaste famille peut généralement être compensée, partiellement ou totalement, par l'activité des autres (Rutkevich et al., 2010). Les PDI ne sont pas redondantes pour autant de par (i) leur spécificité de substrats (Jessop et al., 2009), (ii) leur activité préférentielle en tant qu'oxydase ou réductase, en fonction de leur potentiel de réduction standard (Määttä et al., 2010) et (iii) leurs activités autres qu'enzymatique. Par exemple, certaines PDI possèdent, en plus de leur activité oxydoréductase, une activité *chaperone-like* (Määttä et al., 2010).

Les PPI, aussi appelées rotamases, forment une autre famille d'enzymes de repliement qui catalysent l'isomérisation *cis-trans* des liens peptidyl-prolyl entre un acide aminé quelconque et une proline (Gidalevitz et al., 2013). Dans le RE, deux branches de la famille des PPI sont représentées : les cyclophilines et les *FK506-binding proteins* (FKBP), dont les membres les plus étudiés sont présentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Principaux membres de la machinerie de repliement, de contrôle qualité et de dégradation des protéines dans le RE.

Famille	Principaux membres	Fonctions
Hsp70	BiP/GRP78	Chaperonne Contrôle qualité des protéines
Hsp90	Endoplasmine/GRP94	Chaperonne
Hsp40	ERdj1-ERdj7	Co-chaperonnes de BiP ERdj5 : activité réductase
Lectines	CNX, CRT	Chaperonne Contrôle qualité des glycoprotéines
	EDEM 1, 2, 3	Elagage des mannoses de la chaîne N-glycanique
	OS9, XTP3B	Reconnaissance des protéines à dégrader (glycoprotéines et probablement également les protéines non glycosylées)
Enzymes modifiant la chaîne N-glycanique	GI, GII	Coupage des résidus glucose de la chaîne N-glycanique
	GT	Contrôle qualité des glycoprotéines
	ER-ManI	Elagage des mannoses de la chaîne N-glycanique
PDI	PDI (PDIA1) ERp57 (PDIA3) ERp72 (PDIA4) P5 (PDIA6)	Formation, rupture et isomérisation des ponts disulfures
PPI	Cyclophiline B FKBP13, 23, 65	Isomérisation <i>cis-trans</i> des liaisons peptidyl-prolyl

1.2. Contrôle qualité des protéines

L'importance cruciale d'un repliement adéquat des protéines a conduit à la mise en place, au cours de l'évolution, d'un système de contrôle qualité visant à vérifier la conformation des protéines pendant et à l'issue des étapes de repliement. Le contrôle qualité est basé sur la reconnaissance des séquences hydrophobes par deux principaux « examinateurs » : la chaperonne BiP (Flynn et al., 1991) et l'enzyme *UDP-glucose-Glycoprotein Glucosyl Transferase* (GT) (Caramelo et al., 2003). Tant qu'une protéine expose des parties hydrophobes, elle sera retenue dans le RE pour compléter son repliement et atteindre sa conformation native. Elle subira des contrôles répétitifs jusqu'à ce qu'elle soit correctement repliée. A la fin de chaque contrôle, soit la protéine est correctement repliée et pourra être transportée vers l'appareil de Golgi, soit elle est identifiée comme définitivement mal/non repliée et sera adressée vers les voies de dégradation.

Il existe deux systèmes de contrôle qualité des protéines dans le RE. Le premier, basé sur la reconnaissance des séquences hydrophobes par BiP, est commun à toutes les protéines, qu'elles soient glycosylées ou non. Le deuxième est propre aux glycoprotéines car il est basé à la fois sur la reconnaissance des séquences hydrophobes par la GT et sur la structure de la chaîne N-glycanique. Ce dernier système, nommé « système basé sur le code glycane », est

bien mieux décrit que le premier basé sur BiP. De ce fait, il sera présenté en premier afin de servir d'exemple pour illustrer les principes de fonctionnement d'un système de contrôle qualité des protéines.

1.2.1. Système de contrôle qualité basé sur le « code glycan »

Dès que la chaîne peptidique, en cours de traduction, émerge dans la lumière du RE, le complexe enzymatique *Oligosaccharyl Transferase* (OST), associé au translocon, transfère en bloc une chaîne glycanique de formule unique : $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ (**Fig 3** et **Fig 4**) sur le résidu Asn de la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (Chavan and Lennarz, 2006). Ce processus de N-glycosylation est distinct du processus de O-glycosylation dans l'appareil de Golgi, qui consiste en l'ajout successif de sucres individuels sur les groupements –OH des acides aminés Ser et Thr (Stanley, 2011). Ce chapitre n'abordant que la glycosylation des protéines dans le RE, la N-glycosylation sera par la suite désignée par glycosylation.

La chaîne glycanique transférée en bloc est rapidement modifiée par les enzymes GI et GII, conduisant à une structure mono-glucosylée $\text{Glc-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ reconnue par les lectines-chaperonnes CNX/CRT (Vassilakos et al., 1998) (**Fig 3**). La GII coupe aussi le dernier résidu glucose, générant la chaîne déglucosylée $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ qui n'est plus reconnue par CNX/CRT. A l'inverse, l'enzyme GT rajoute un résidu glucose, régénérant la chaîne glycanique reconnue par CNX/CRT (Caramelo et al., 2003). La GT ne reconnaissant son substrat que s'il expose des patches hydrophobes, seules les glycoprotéines incomplètement repliées sont de nouveau adressées vers le complexe CNX/CRT-ERp57 afin de poursuivre leur repliement. L'ensemble de ces événements constitue le cycle CNX/CRT, qui peut se répéter plusieurs fois pour une même glycoprotéine.

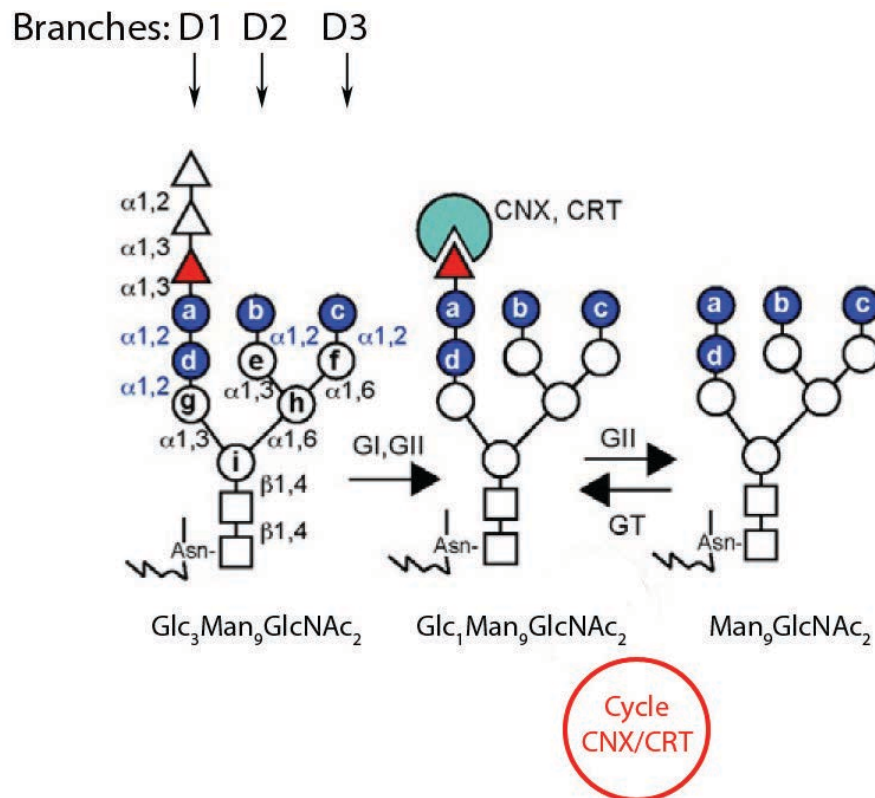


Figure 3. Modifications des chaînes N-glycaniques des glycoprotéines dans le RE (adapté de Benyair et al., 2011)

Dans la chaîne glycanique de formule unique (à gauche) transférée sur un résidu Asn, les résidus Glc, Man et GlcNAc sont représentés respectivement par des triangles, des ronds et des carrés. Les deux résidus Glc en blanc sont coupés par les enzymes glucosidases I et II (GI et GII), donnant la structure monoglucosylée reconnue par CNX/CRT (au milieu). Le résidu Glc en rouge peut être coupé par la GII ou rajouté à nouveau par l'*UDP-glucose-Glycoprotein Glucosyl Transferase* (GT). Les résidus α1,2-Man en bleus sont ceux qui peuvent être coupés par les protéines réticulaires à activité mannosidase.

Afin d'éviter les cycles répétitifs et les tentatives inutiles de repliement, les glycoprotéines définitivement mal/non repliées sont retirées du cycle CNX/CRT et adressées vers la dégradation, cela par le processus d'élitage des résidus mannoses α1,2 (*mannose trimming*) de la chaîne glycanique (résidus en bleu dans la **Fig 3**). Les enzymes responsables de l'élitage des mannoses sont la *ER α1,2-Mannosidase I* (ER-ManI) (Tremblay and Herscovics, 1999) et les protéines *ER Degradation-Enhancing α1,2-Mannosidase-like* (EDEM 1, 2 et 3 chez les mammifères) (Hirao et al., 2006; Hosokawa et al., 2010). Les protéines EDEM sont des lectines qui accélèrent l'élitage des mannoses probablement en stimulant l'activité mannosidase de la ER-ManI et/ou en étant elles-mêmes des mannosidases. Les lectines EDEM reconnaîtraient les chaînes glycaniques dont un ou plusieurs résidus

mannose ont été coupés par la ER-ManI (Hosokawa et al., 2001), cependant la nature exacte de ces structures n'est pas encore bien caractérisée.

Plus une glycoprotéine séjourne longtemps dans le RE, plus grand sera le nombre de résidus mannose α -1,2 de sa chaîne glycanique coupés, jusqu'à la génération de structures $\text{Man}_{6-5}\text{GlcNAc}_2$ (Hosokawa et al., 2003). L'élitage des mannoses agit comme un « minuteur » du contrôle qualité des glycoprotéines (**Fig 4**) par plusieurs mécanismes.

- La coupure progressive des mannoses réduit l'efficacité de reglucosylation par la GT, même si le résidu mannose (a) (*cf* **Fig 3**) est toujours présent (Sousa et al., 1992). Cela permet d'éviter l'association répétitive de la glycoprotéine à CNX/CRT.
- Plus l'élitage des mannoses est avancé, notamment les résidus de la branche D1 (*cf* **Fig 3**), moins la glycoprotéine a de chance d'être reconnue par les lectines comme *ER-Golgi intermediate compartment 53* (ERGIC53), *Vesicular integral membrane protein 36* (VIP36) et *VIP36-like protein* (VIPL), qui servent de récepteurs pour concentrer les protéines dans les vésicules recouvertes d'un manteau protéique de type Coat Protein complex II (COPII) en route pour l'appareil de Golgi (Kamiya et al., 2008) (*cf* §1.3 p27).
- Les structures $\text{Man}_{7-5}\text{GlcNAc}_2$ issues d'un élitage extensif des mannoses sont reconnues préférentiellement par les lectines spécifiques de la dégradation comme *l'Osteosarcoma amplified 9* (OS9) et la *XTP3-transactivated gene B protein* (XTP3B) (Frenkel et al., 2003; Hosokawa et al., 2009a).

En résumé, une glycoprotéine reconnue par les lectines/mannosidases EDEM sera extraite progressivement des cycles CNX/CRT et identifiée comme protéine à dégrader quand elle sera reconnue par les lectines OS9 ou XTP3B (Groisman et al., 2011).

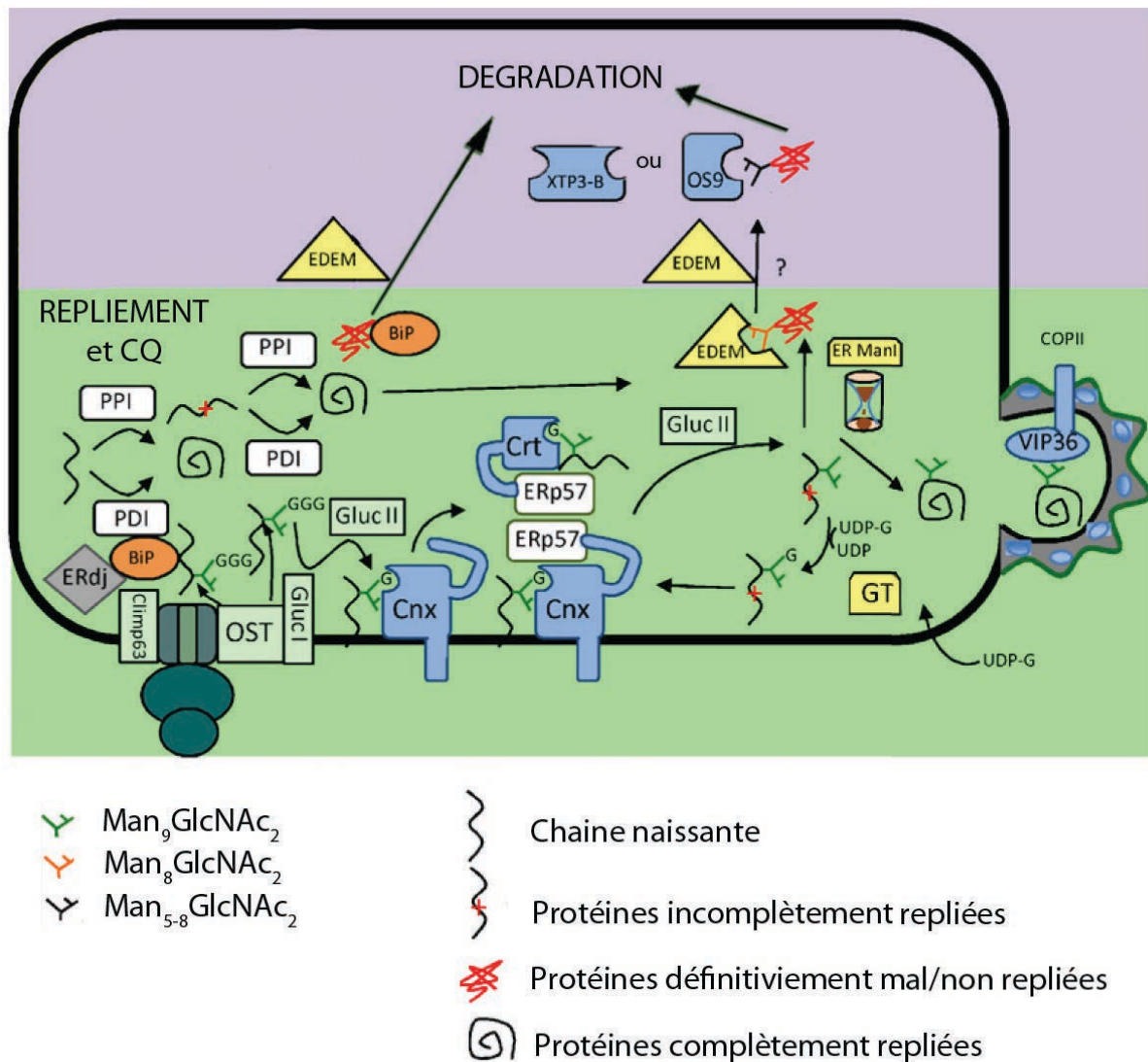


Figure 4. Contrôle qualité des protéines dans le RE (adapté de Määttanen, 2010)

Pour des raisons de simplicité, le contrôle qualité (CQ) des protéines est illustré selon qu'elles sont glycosylées (à droite) ou non (à gauche). L'intervention de BiP dans le contrôle qualité des glycoprotéines n'est pas présentée.

1.2.2. Système de contrôle qualité basé sur BiP

Comparé au système basé sur le « code glycan », le système de contrôle qualité basé sur la reconnaissance des séquences hydrophobes par BiP reste moins bien décrit. Moins une protéine est repliée, plus elle expose des séquences hydrophobes qui seront reconnues par BiP (Flynn et al., 1991), ce qui retient la protéine dans le RE. La décision entre la poursuite du repliement ou l'adressage vers les voies de dégradation dépendrait de la stabilité de la liaison de BiP, car il a été montré que l'association *in vitro* de BiP à des modèles de protéines mal repliées est plus stable comparée aux protéines normales (Sörgjerd et al., 2006). Cette stabilité semblerait être modulée par les co-chaperonnes de BiP. En effet, ERdj3 (Jin et al., 2009) et

ERdj4 (Dong et al., 2008) peuvent se lier directement aux protéines « clientes » indépendamment de BiP, ce qui laisse penser que ces co-chaperonnes pourraient elles aussi reconnaître l'état de repliement de la protéine et influencer la stabilité de la liaison de BiP à ses « clientes », et donc leur devenir.

Par ailleurs, plusieurs modèles de protéines destinées à la dégradation co-précipitent avec BiP et les composants du complexe de rétro-translocation (Dong et al., 2008; Okuda-Shimizu and Hendershot, 2007) (*cf* §1.4.1 p29). Cela suggère que l'association prolongée de BiP aux protéines non/mal repliées constituerait un mécanisme de contrôle qualité et d'adressage vers les voies de dégradation.

Les mécanismes de contrôle qualité des protéines non glycosylées semblent en fait encore plus complexes dans la mesure où il a été montré que ces dernières peuvent aussi être reconnues par les lectines XTP3B, OS9 et EDEM, sans que les bases moléculaires de ces interactions aient pu être établies (Christianson et al., 2008; Cormier et al., 2009; Tang et al., 2014).

1.3. Exportation des protéines correctement repliées vers l'appareil de Golgi

L'exportation des protéines du RE vers l'appareil de Golgi se fait par l'intermédiaire de transporteurs vésiculaires recouverts d'un manteau protéique de type COPII qui bourgeonnent à partir du RE (**Fig 5**). L'empaquetage des cargos dans les vésicules COPII peut suivre deux modèles non exclusifs : le modèle « *bulk flow* » dans lequel certains cargos sont empaquetés de manière non spécifique et le modèle « sélection et concentration de cargos » qui fait intervenir des récepteurs (Barlowe, 2003). Les cargos transmembranaires sont recrutés vers les sites de bourgeonnement grâce aux motifs d'export dans leur partie cytoplasmique, qui permettent l'interaction avec le manteau COPII (Mancias and Goldberg, 2008). Pour les cargos solubles, ils sont reconnus par des récepteurs de cargos, qui eux sont transmembranaires et peuvent interagir avec le manteau. Ces récepteurs sont de trois types : la famille des *L-type* lectines (qui regroupe ERGIC53, VIPL et VIP36) (Nufer et al., 2003), la famille des protéines p24 (Strating and Martens, 2009) et la famille des *ER-derived Vesicle proteins* (Belden and Barlowe, 2001). Quelques déterminants sur les cargos solubles qui permettent l'interaction avec les récepteurs ont été identifiés, dont certaines structures glycaniques (Kamiya et al., 2008).

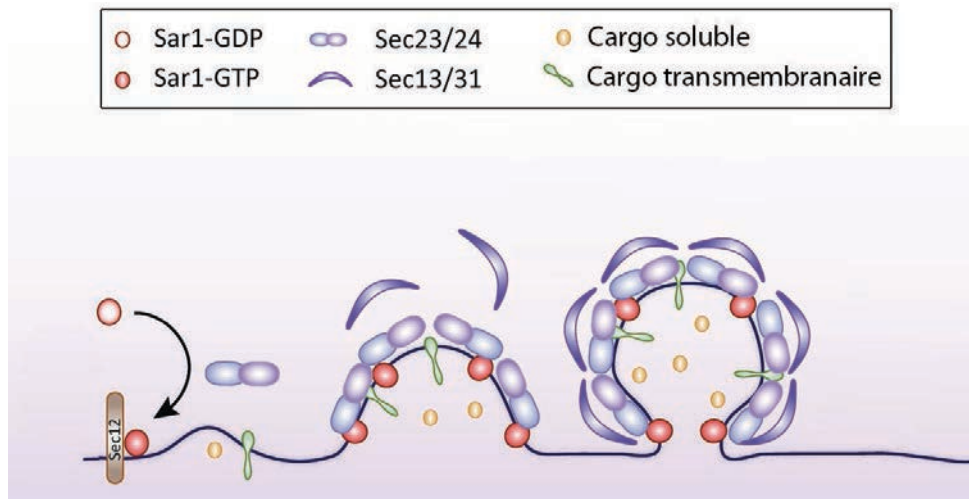


Figure 5. Concentration des cargos dans les vésicules COPII (adapté de Venditti et al., 2014)

Sec12, situé à la membrane du RE, catalyse l'échange du GDP contre un GTP sur la petite GTPase Sar1. Sar1-GDP est soluble tandis que Sar1-GTP est ancrée à la membrane du RE. Sar1-GTP recrute Sec23/Sec24, puis Sec13-Sec31, l'ensemble formant le manteau COPII. Les cargos transmembranaires sont incorporés dans la vésicule COPII grâce à leur interaction avec Sec24. Les cargos solubles sont reconnus par les récepteurs de cargos qui eux sont transmembranaires et peuvent interagir avec le manteau (ces récepteurs ne sont pas représentés dans la figure).

Comment le RE s'assure-t-il que seules les protéines correctement repliées sont exportées? Plusieurs mécanismes ont été proposés.

- Le modèle général est plutôt la rétention dans le RE de tout ce qui n'est pas « prêt » à être exporté. La machinerie de contrôle qualité qui interagit avec les protéines réduirait leur mobilité et ainsi leur accès aux sites de bourgeonnement. Elle peut aussi générer des gênes stériques ou masquer les signaux d'export, ce qui empêche les protéines mal/non repliées d'être capturées dans les vésicules COPII (Ellgaard and Helenius, 2003).
- Il pourrait exister un contrôle qualité exercé directement par les récepteurs de cargos, basé sur l'identification d'un déterminant conformationnel sur le cargo, comme dans le cas de l'interaction de la procathepsine Z avec ERGIC53 (Appenzeller-Herzog, 2005).
- L'empaquetage dans les vésicules COPII pourrait demander une combinaison de signaux d'export sur le cargo. Ainsi, les protéines exposeraient plus ou moins de signaux d'export, en fonction de leur état de repliement, et de ce fait interagiraient avec plus ou moins d'affinité avec les récepteur de cargos (ou les composants du manteau) (Barlowe, 2003).

1.4. Dégradation des protéines

L'absence de protéases dans le RE implique que les protéines à dégrader, luminales ou membranaires, soient extraites du RE et adressées soit vers le protéasome soit vers les lysosomes. Les protéines mal/non repliées et identifiées comme protéines à dégrader sortent du RE par plusieurs mécanismes.

- La plupart sont rétro-transloquées vers le cytoplasme via un canal protéique assemblé dans la membrane du RE, appelé « rétro-translocon » ou « dislocon », et seront prises en charge par le protéasome (un phénomène appelé « rétro-translocation », ou « dislocation »). Pour des raisons historiques, le terme « *ER-associated degradation* » (ERAD), malgré son sens large, est restreint à ce mécanisme de dégradation. En conséquence, le terme « dégradation des protéines du RE » est utilisé pour désigner l'ensemble des mécanismes de dégradation.
- Les protéines qui ont tendance à former des agrégats dans le RE, ou des complexes multiprotéiques préassemblés, en raison de leur grande taille, ne peuvent pas être rétro-transloqués via un canal protéique, ni être dégradés dans la cavité protéolytique 20S du protéasome. Ces entités sont ségrégées du RE par l'intermédiaire des autophagosomes (voie de la réticulophagie) ou par une catégorie de vésicules contenant la lectine EDEM1 (voie des vésicules EDEM) et dégradées dans les lysosomes.

1.4.1. Voie ERAD

La voie ERAD consiste en la rétro-translocation des protéines, leur ubiquitination et leur dégradation dans le protéasome. Le complexe de rétro-translocation est un complexe multiprotéique organisé à la membrane du RE, qui implique des protéines transmembranaires, luminales et cytosoliques (Merulla et al., 2013) (**Fig 6**). Il permet de coordonner spatialement et temporellement la réception, la rétro-translocation proprement dite et l'ubiquitination du substrat avant sa dégradation par le protéasome 26S. Chez la levure comme chez les mammifères, il existe différents complexes de rétro-translocation. Chaque substrat de la voie ERAD a une préférence plus ou moins stricte pour un type particulier de complexe, selon l'endroit où se situe le défaut de repliement (partie luminale, transmembranaire ou cytosolique), quoique cette affirmation soit moins évidente chez les mammifères (Carvalho et al., 2006). Par ailleurs, les protéines glycosylées et non glycosylées requièrent des facteurs distincts de la voie ERAD (Okuda-Shimizu and Hendershot, 2007).

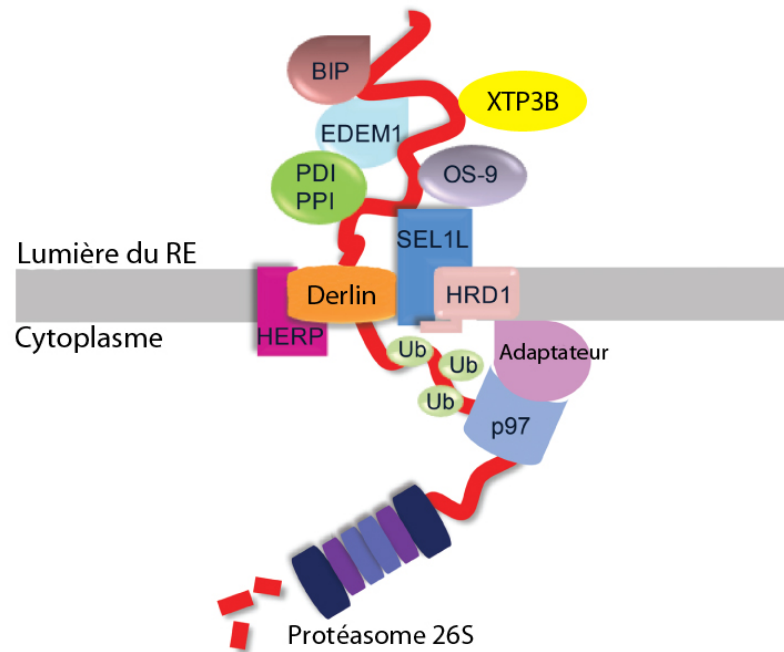


Figure 6. Organisation du complexe de rétro-translocation autour de son substrat, exemple du complexe HRD1 (adapté de Merulla et al., 2013)

Les protéines mal/non repliées sont reconnues par EDEM1, OS9, XTP3B ou BiP, qui interagissent avec SEL1L. En présence de Herp, le complexe s'assemble autour du substrat. La protéine à dégrader est rétro-transloquée vers le cytoplasme par l'intermédiaire du canal protéique formé par Derlin. Ce processus est assisté par BiP, des PDI et des PPI du côté luminal et VCP/p97 du côté cytoplasmique. Dès que la protéine émerge dans le cytoplasme, elle est ubiquitinylée par HRD1, ce qui conduit à sa dégradation dans le protéasome.

La première étape de la voie ERAD consiste en l'identification des substrats à dégrader. Les défauts de repliement situés dans la partie luminale des protéines sont reconnus par BiP et les lectines spécifiques de la voie ERAD comme EDEM, OS9 ou XTP3B (Groisman et al., 2011). Quant aux défauts de repliement situés dans la partie cytoplasmique d'une protéine transmembranaire du RE, ils sont reconnus par les chaperonnes cytosoliques comme Hsp70 (Grove et al., 2011).

Ces lectines et chaperonnes délivrent ensuite la protéine à dégrader à un composant du complexe de rétro-translocation qui joue le rôle de récepteur de substrats. Par exemple, dans le cas du complexe organisé autour de l'Ubiquitine ligase *HMG-CoA Reductase Degradation protein 1* (HRD1), la réception du substrat est assurée par la protéine *Sel-1 suppressor of lin-12-like* (SEL1L). Cette dernière interagit avec EDEM1, OS9, XTP3B et BiP (Christianson et al., 2008; Cormier et al., 2009; Hosokawa et al., 2008). Suite à la réception du substrat par SEL1L, le complexe de rétro-translocation s'assemble grâce à la protéine *Endoplasmic Reticulum stress-inducible protein* (Herp) (Leitman et al., 2014).

Plusieurs candidats ont été proposés comme jouant le rôle de canal de rétro-translocation en se basant sur leur structure polytopique et leur interaction directe avec les substrats : la famille des Derlins (Lilley and Ploegh, 2004), Sec61 qui est aussi le canal de translocation co-traductionnelle des protéines dans le RE (Plemper et al., 1997), et l'Ubiquitine ligase HRD1 (Carvalho et al., 2010).

Des deux côtés de la membrane, plusieurs facteurs assistent à la rétro-translocation du substrat. Au niveau luminal, BiP et les membres de la famille des PDI et PPI contribuent à déplier le substrat, du moins partiellement (Dong et al., 2008; Bernasconi et al., 2010). Au niveau cytoplasmique, le complexe enzymatique VCP/p97, recruté par le complexe de rétro-translocation, utilise l'hydrolyse de l'ATP probablement pour déplier les substrats et également les « tirer » physiquement vers le cytoplasme. VCP/p97 est présent dans tous les complexes de rétro-translocation et est indispensable à la voie ERAD (Rabinovich et al., 2002; Ye et al., 2005).

Le substrat est ubiquitinylé au fur et à mesure qu'il émerge dans le cytoplasme grâce à des enzymes de type E2 et E3 du système ubiquitine qui font partie intégrante du complexe de rétro-translocation (Kostova et al., 2007). Chez les mammifères, il existe plusieurs E3 ligases dont beaucoup sont encore mal caractérisées mais qui semblent agir de manière substrat-spécifique (Kostova et al., 2007). L'ubiquitinylation du substrat mène à sa dégradation dans le protéasome 26S.

1.4.2. Voie impliquant la réticulophagie

La réticulophagie est une forme particulière de l'autophagie, qui séquestre de manière sélective des portions du RE dans des autophagosomes selon un mécanisme encore mal caractérisé (Bernales et al., 2007) (Cebollero et al., 2012). Sachant que le RE est l'une des sources membranaires des autophagosomes (*cf* §4.2.3 p72), il est proposé qu'au cours de la réticulophagie, la membrane du RE soit localement remodelée de sorte que les parties du RE à dégrader seront enveloppées dans les membranes du même compartiment avant d'être détachées du reste du RE et dégradées dans les lysosomes (**Fig 7**).



Figure 7. Visualisation par microscopie électronique d'un autophagosome contenant des portions du RE (Bernales et al., 2007)

On note la présence de ribosomes à la fois sur les deux couches de membrane qui délimitent l'autophagosome et sur la membrane contenue dans celui-ci, ce qui suggère que ces membranes dérivent, du moins partiellement, du RE.

Plusieurs études ont montré que les agrégats protéiques qui se forment dans le RE ne sont pas dégradés par la voie ERAD mais par réticulophagie car :

- l'inhibition de la machinerie autophagique augmente le nombre d'agrégats protéiques au sein du RE, ce qui suggère que ces agrégats sont normalement séquestrés dans les autophagosomes directement à partir du RE, sans passer par une étape intermédiaire dans le cytoplasme (Kruse et al., 2006; Kruse, 2005; Kamimoto et al., 2006).
- ces agrégats co-localisent à la fois avec des protéines résidentes du RE et avec un marqueur des autophagosomes (Kamimoto et al., 2006).
- des portions du RE ont été visualisées, en microscopie électronique, dans un autophagosome qui contient la protéine à dégrader (Teckman and Perlmuter, 2000).

De manière intéressante, la dégradation par l'autophagie ne serait pas simplement un moyen pour remédier aux contraintes de taille qui empêchent la dégradation par la voie ERAD. Le mutant E90K du récepteur *gonadotropin-releasing hormone receptor*, même s'il ne forme pas d'agrégats, est résistant à la dégradation par la voie ERAD, et est dégradé spécifiquement par la voie de l'autophagie (Houck et al., 2014). Cela suggère que la dégradation par réticulophagie pourrait être spécifique du substrat (**Fig 8**).

Tout comme les remodelages membranaires au cours de la réticulophagie, les mécanismes par lesquels les protéines réticulaires à dégrader sont concentrées dans les autophagosomes restent inconnus.

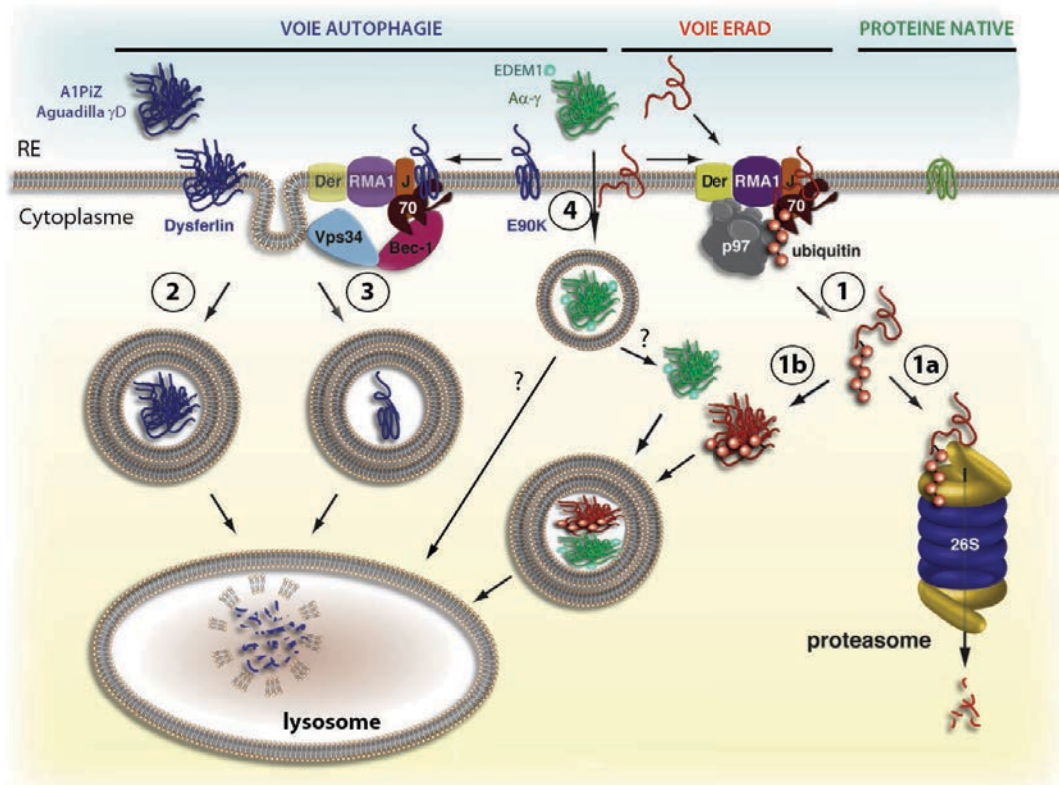


Figure 8. Modèle des différentes voies de dégradation des protéines du RE (adapté de Buchberger, 2014 et de Le Fourn et al., 2013)

Les protéines natives (*en vert clair*) sont exportées vers l'appareil de Golgi. Les protéines mal/non repliées dans le RE (dont quelques exemples sont notés dans la figure) sont dégradées par différentes voies. **1.** La plupart (*en rouge*) sont dégradées par la voie ERAD. **1a.** L'exemple présenté concerne une protéine transmembranaire avec des défauts de repliement dans la partie cytosolique, reconnus par les chaperonnes Hsp70 (cytosolique) (*en marron*) et JB12 (transmembranaire du RE) (*forme notée J en orange*). La protéine est ubiquitinylée par l'ubiquitine ligase RMA1 (*en violet*) et dégradée dans le protéasome. **1b.** Si après rétro-translocation la protéine forme des agrégats dans le cytoplasme, ceux-ci seront dégradés par agréphagie. **2 et 3.** Certaines protéines mal/non repliées ayant tendance à former des agrégats (2) ou non (3) (*en bleu sombre*) seraient dégradées par réticulophagie. Bien que la protéine E90K (*en bleu sombre*) se retrouve dans le complexe de rétro-translocation (Derlin et RMA1), elle n'est pas ubiquitinylée ni rétro-transloquée. Le complexe Vps35/Bec1-1 (Bec-1), un des complexes qui initie la formation des autophagosomes, interagit avec la chaperonne JB12. **4.** Les vésicules EDEM, qui contiennent EDEM1 (*en turquoise*) permettent d'extraire certaines protéines du RE (*en vert foncé*). Les mécanismes menant à la dégradation du contenu des vésicules EDEM dans les lysosomes restent en débat (présence du signe « ? »). En effet, soit la vésicule EDEM fusionne directement avec les lysosomes, soit il y a une dissolution de sa couche lipidique selon un mécanisme inconnu, et les protéines précédemment contenues dans les vésicules seront dégradées par agréphagie.

1.4.3. Voie impliquant les vésicules EDEM

Des travaux récents ont identifié une nouvelle catégorie de vésicules bourgeonnant du RE. Ces vésicules (i) ne sont pas recouvertes de manteau COPII et (ii) sont distinctes des autophagosomes car elles possèdent une simple membrane et sont recouvertes de la forme I de la protéine *Microtubules-associated protein-light chain 3* (LC3-I), et non de la forme LC3-II, qui est un marqueur des autophagosomes (Zuber et al., 2007; Calì et al., 2008) (la conversion de la forme LC3-I à LC3-II est détaillée dans la partie cf §4.2.2 p68). Ces vésicules ont été nommées « EDEMosomes », ou « vésicules EDEM » car elles contiennent, entre autres, la lectine EDEM1. Elles ont aussi été nommées « vésicules de régulation d'ERAD (*ERAD tuning*) » car elles permettent de ségréger certains acteurs de la machinerie ERAD tels que EDEM1, OS-9 et SEL1L hors du RE et de les mener à la dégradation dans les lysosomes, contrôlant ainsi la quantité d'acteurs disponibles dans le RE pour l'activité ERAD (Bernasconi et al., 2012) (détaillé dans le §1.5.3 p36). De manière intéressante, les vésicules EDEM peuvent aussi contenir des protéines mal/non repliées (Zuber et al., 2007) ou des complexes multiprotéiques (Le Fourn et al., 2013) à dégrader. Ainsi, les vésicules EDEM constituent une autre voie de dégradation des protéines du RE, à côté de la voie ERAD et de la voie par réticulophagie.

Le mécanisme qui mène à la dégradation du contenu des vésicules EDEM dans les lysosomes n'est pas clairement établi. Le groupe de Roth a montré que dans le cytoplasme, la couche lipidique des vésicules EDEM est dissoute selon un mécanisme inconnu, et que les protéines précédemment contenues dans ces vésicules sont dégradées par agréphagie, une forme d'autophagie qui cible de manière sélective les agrégats protéiques (Le Fourn et al., 2013; Fourn et al., 2009; Park et al., 2014) (cf §4.1.2 p64 pour les différentes formes d'autophagie sélective). Par contre, d'autres études ont montré que la machinerie autophagique n'était pas nécessaire pour la dégradation du contenu des vésicules EDEM, et ont proposé que ces dernières fusionnent avec les lysosomes (Calì et al., 2008; Reggiori et al., 2010).

1.5. Compartimentation du RE

L'ensemble des données présentées précédemment suggère que le RE ne doit pas être considéré comme un compartiment homogène. Les diverses fonctions du RE (repliement et contrôle qualité des protéines, exportation des protéines correctement repliées vers l'appareil de Golgi et dégradation des protéines mal/non repliées) sont effectivement très compartimentées (Leitman et al., 2013) (**Fig 9**).

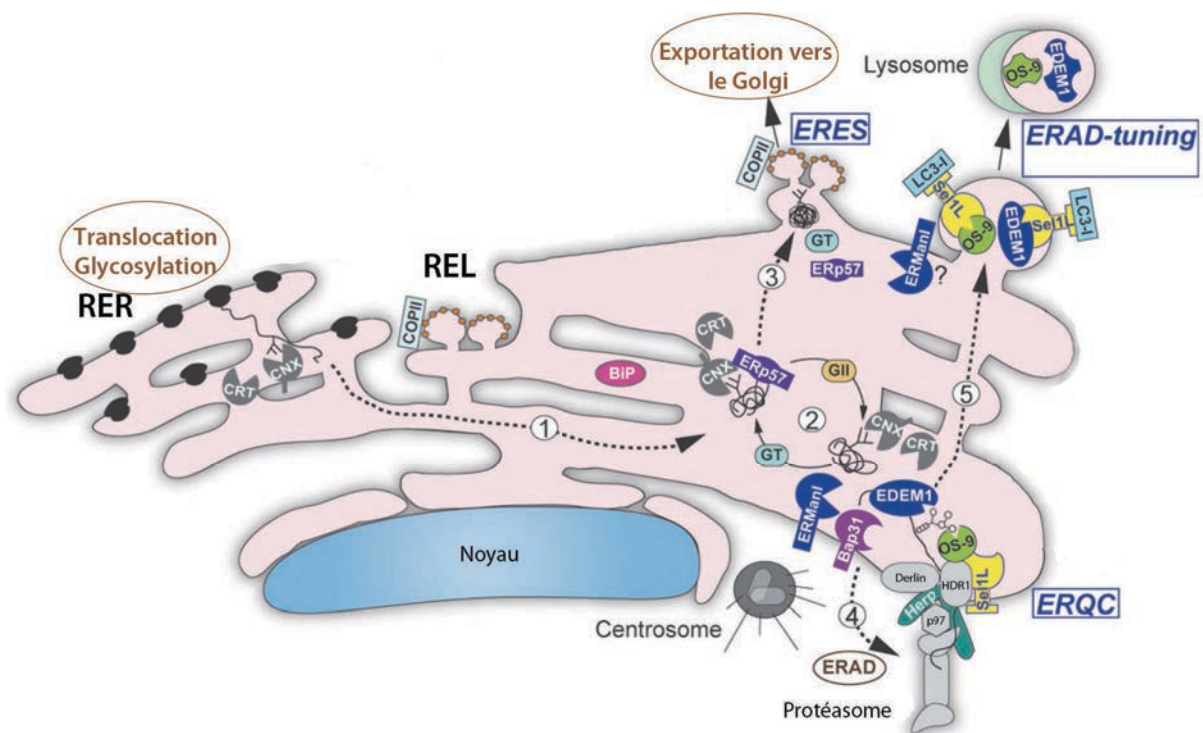


Figure 9. Modèle de compartimentation du RE (adapté de Leitman et al., 2013)

Le RE rugueux (RER) se distingue du RE lisse (REL) par l'association des ribosomes à leur membrane. **1.** Le RER est le lieu de translocation co-traductionnelle et de début de repliement des protéines de la voie sécrétoire conventionnelle. **2.** Le cycle CNX/CRT assure le contrôle qualité des glycoprotéines (Le contrôle qualité des protéines non glycosylées n'est pas représenté). **3.** Si la protéine atteint sa conformation native, elle sera dirigée vers les sites *ER exit sites* (ERES) pour être exportée vers l'appareil de Golgi. **4.** L'élagage des mannoses permet d'extraire la protéine des cycles CNX/CRT si elle n'arrive pas à atteindre sa conformation native. La protéine identifiée comme définitivement mal/non repliée sera transportée de la périphérie du RE vers le sous-compartiment ERQC situé dans la région péri-centrosomale, avec l'aide de Bap31 et probablement de CNX/CRT et des protéines EDEM. D'autres acteurs de la voie ERAD comme OS9, XTP3B, SEL1 et le complexe de rétro-translocation sont concentrés dans le sous-compartiment ERQC. La dégradation des protéines par la voie de l'autophagie n'est pas restreinte au sous-compartiment ERQC et n'est pas présentée dans cette figure. **5.** EDEM1, OS9 et SEL1L sont ségrégés du RE dans des vésicules recouvertes de LC3-I, et seront dégradés dans les lysosomes.

1.5.1. ER exit sites (ERES)

Les sites *ER exit sites* (ERES) sont des sites particuliers du RE d'où bourgeonnent les vésicules COPII en route pour l'appareil de Golgi (Hammond and Glick, 2000). Plusieurs bourgeonnements peuvent être initiés à partir d'un site ERES, grâce au recyclage des composants du manteau COPII. Les ERES sont localisés dans les zones du RE dépourvues de ribosomes. Ils sont situés dans la région périnucléaire, mais aussi répartis vers la périphérie. Les raisons de leur localisation restreinte ne sont pas complètement comprises. Il a été montré

que Sec16 joue un rôle d'échafaudage dans l'organisation des ERES, et participe ainsi à la définition de leur localisation (Watson et al., 2006).

1.5.2. Sous-compartiment de dégradation par la voie ERAD

L'inhibition de la voie ERAD ou la perturbation du repliement des protéines conduit à une accumulation de protéines mal/non repliées dans un sous-compartiment spécifique du RE, situé dans la région péri-centrosomale. Dans ces conditions, CNX/CRT, EDEM1 ainsi que des composants du complexe de rétro-translocation comme Herp, HRD1, Derlin-1, VCP/p97 se concentrent dans ce sous-compartiment alors que BiP, PDI, ERp57 et GT restent distribuées de manière homogène dans le RE (Kamhi-Nesher et al., 2001; Frenkel et al., 2004; Kondratyev et al., 2007). De manière intéressante, OS9 et ER-ManI sont constitutivement localisés dans ce sous-compartiment (Avezov et al., 2008; Ron et al., 2011). Ces observations suggèrent qu'il s'agit d'un sous-compartiment où se déroule la dégradation des protéines par la voie ERAD, avec des acteurs présents en permanence, et d'autres acteurs qui y sont recrutés pour renforcer l'activité ERAD lors d'une accumulation de protéines mal/non repliées.

Lorsqu'il a été mis en évidence, ce sous-compartiment a été nommé sous-compartiment *ER Quality Control* (ERQC) car il était considéré comme le site où a lieu « l'ultime » contrôle qualité d'une protéine avant que celle-ci ne soit adressée vers la machinerie de dégradation (Kamhi-Nesher et al., 2001). Ce nom historique sera conservé dans la suite de ce manuscrit.

1.5.3. Régulation d'ERAD (*ERAD tuning*)

Le processus *ERAD tuning* consiste en la dégradation rapide des acteurs de la voie ERAD, donnant un avantage cinétique aux protéines en cours de repliement afin qu'elles ne soient pas dégradées. Tandis que HRD1 et Herp sont dégradées dans le protéasome (Hori et al., 2004; Iida et al., 2011), EDEM1, OS9 et SEL1L sont dégradées par un mécanisme similaire mais distinct de l'autophagie. Il a été montré que EDEM1 et OS9 quittent le RE de manière sélective dans des vésicules recouvertes de la protéine LC3-I, et seront dégradés dans les lysosomes (Cali et al., 2008; Reggiori et al., 2010). Le recrutement d'EDEM1 et d'OS9 dans ces vésicules est médié par SEL1L, qui interagit avec EDEM1 et OS9 *via* sa partie luminale et avec LC3-I *via* sa partie cytoplasmique (Bernasconi et al., 2012). Ces vésicules,

appelées EDEMosomes, sont distinctes des autophagosomes et des vésicules COPII (Calì et al., 2008).

En résumé, les protéines en cours de repliement, qui se trouveraient hors du sous-compartiment ERQC, seraient protégées de la dégradation par deux mécanismes : d'une part, la ségrégation de la machinerie d'ERAD dans le sous-compartiment ERQC et d'autre part, le processus *ERAD tuning*, qui permet de contrôler la disponibilité des acteurs d'ERAD dans les zones hors du sous-compartiment ERQC.

Le RE est un organe hautement compartimenté, doté d'une machinerie complexe de chaperonnes moléculaires, de lectines et d'enzymes qui assurent le repliement et le contrôle qualité des protéines glycosylées et non glycosylées de la voie sécrétoire conventionnelle. Les protéines correctement repliées/assemblées sont exportées vers l'appareil de Golgi dans les vésicules de transport de type COPII. Au contraire, les protéines mal/non repliées et les sous-unités protéiques non assemblées sont adressées vers le cytoplasme où elles seront dégradées dans le protéasome ou dans les lysosomes. Les voies de dégradation des protéines du RE (voie ERAD, voie impliquant la réticulophagie ou voie impliquant les vésicules EDEM) constituent des voies originales de sortie du RE distinctes des vésicules COPII. Elles peuvent ainsi représenter le début de voies de sécrétion non conventionnelles, c'est-à-dire des voies de sécrétion qui ne passent pas par l'appareil de Golgi.

Chapitre II : Sécrétion des protéines : voie conventionnelle *versus* voies non conventionnelles

Les protéines destinées à la voie sécrétoire, qui portent un peptide signal, sont synthétisées dans la lumière du RE puis transportées vers l'appareil de Golgi. Elles y subissent d'autres modifications post-traductionnelles et sont alors triées vers leur destination finale en fonction des signaux qu'elles portent. Cet ensemble d'événements constitue la voie de sécrétion conventionnelle.

Un certain nombre d'observations indique que d'autres protéines dépourvues de peptide signal sont pourtant sécrétées hors de la cellule à partir du cytoplasme. De plus, certaines protéines transmembranaires, synthétisées dans le RE, atteignent la membrane plasmique sans pour autant passer par l'appareil de Golgi. Ces observations ont conduit à l'émergence du concept de voies de sécrétion non conventionnelles. Bien que ces voies soient pour l'instant très incomplètement caractérisées, quelques-unes de leurs propriétés communes ont pu être mises en évidence. Il s'agit notamment de leur caractère inductible par des situations de stress cellulaire, l'implication de la machinerie de l'autophagie et des protéines *Golgi Re-assembly and Stacking Protein* (GRASP). Ce chapitre est dédié aux voies non conventionnelles de sécrétion, avec au préalable un bref survol de la voie conventionnelle.

2.1. Voie de sécrétion conventionnelle

Dans la voie de sécrétion conventionnelle, les protéines synthétisées au niveau du RE sont d'abord transportées à travers le compartiment intermédiaire ERGIC puis rejoignent les citernes de l'appareil de Golgi avant d'atteindre leur destination finale : la membrane plasmique (apicale *versus* basolatérale dans les cellules polarisées), le milieu extracellulaire ou les endosomes tardifs/lysosomes (Szul and Sztul, 2011) (**Fig 10**). La voie sécrétoire n'est pas à sens unique : le trafic du RE vers la membrane plasmique est appelé trafic antérograde, tandis que celui dans le sens contraire est dit rétrograde. Le trafic rétrograde assure le retour du matériel vers les compartiments précédents, comme par exemple le recyclage des récepteurs de cargos vers le compartiment d'origine. Il permet ainsi de maintenir l'identité et le fonctionnement des compartiments de la voie sécrétoire. Il permet également de concentrer progressivement les cargos de la voie antérograde.

Le transport de protéines entre ces différents compartiments se fait par le biais de vésicules de transport qui bourgeonnent à partir du compartiment donneur puis fusionnent avec le compartiment accepteur. Les vésicules COPII bourgeonnent à partir du RE et assurent

le transport antérograde des protéines correctement repliées vers ERGIC ou la citerne cis-Golgi (la citerne la plus proche du RE) (Szul and Sztul, 2011). Les vésicules COPI bourgeonnent d'ERGIC et de l'appareil de Golgi et assurent : (i) le transport dans les deux sens entre ERGIC et la citerne cis-Golgi, (ii) le transport rétrograde d'ERGIC et de la citerne cis-Golgi vers le RE et (iii) le transport rétrograde, et probablement aussi antérograde entre les citernes golgiennes. Les vésicules à clathrine assurent le transport entre le réseau trans-golgien (TGN) et les endosomes, ainsi que du TGN et des endosomes vers la membrane plasmique (Rodriguez-Boulau and Mûsch, 2005).

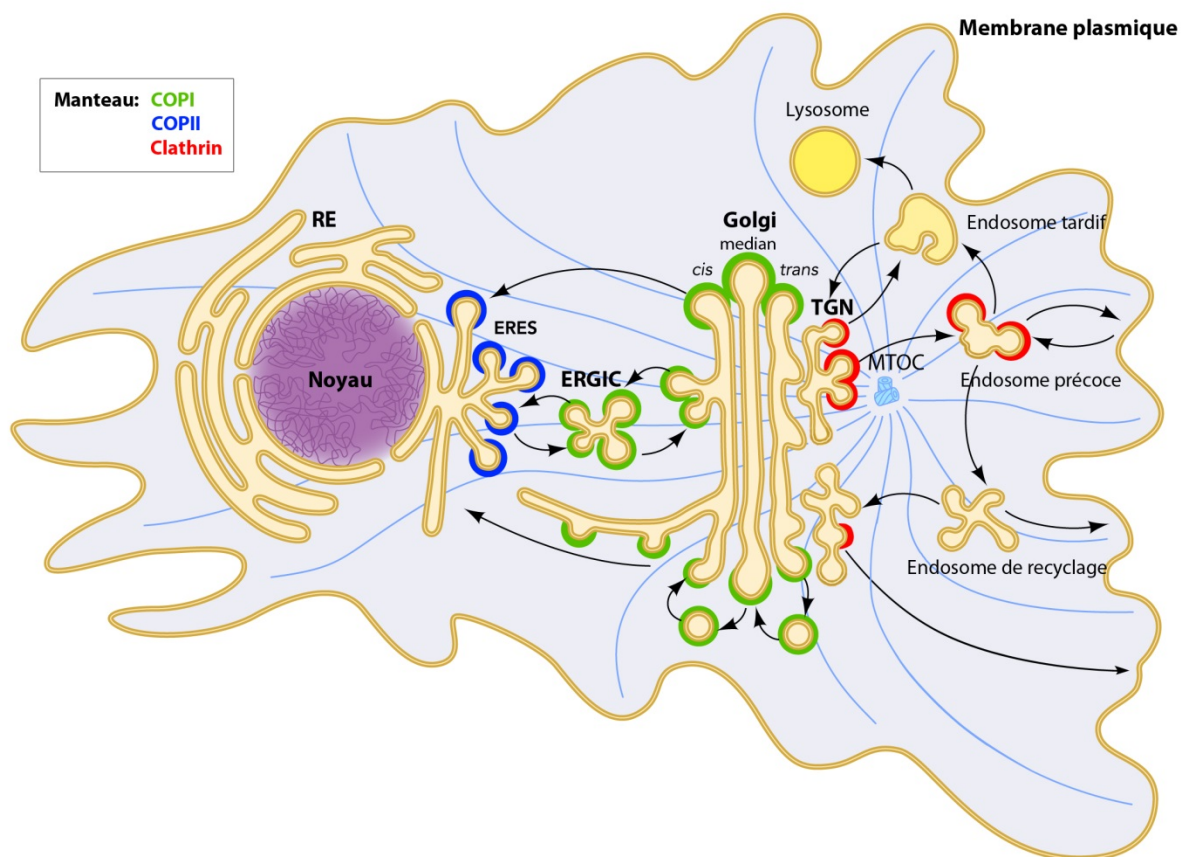


Figure 10. Organisation de la voie sécrétoire conventionnelle (adaptée de Szul and Sztul, 2011)

La partie la plus distale de l'appareil de Golgi, le TGN, joue le rôle de centre de tri qui adresse les protéines vers leur destination finale, en fonction de leur(s) signal (signaux) d'adressage (Rodriguez-Boulau and Mûsch, 2005). Les protéines peuvent aussi être transportées du TGN vers les endosomes précoces ou les endosomes de recyclage où elles sont mélangées aux protéines provenant de l'endocytose. Dans ces endosomes, les cargos de

la voie sécrétoire et ceux de la voie endocytaire sont alors triés soit vers la membrane plasmique, soit vers les endosomes tardifs/lysosomes. Pour les cargos de la voie sécrétoire, on parle de tri post-Golgi, tandis que pour les cargos de la voie endocytaire, on parle soit de voie de recyclage soit de voie de dégradation.

2.2. Voies de sécrétion non conventionnelles

La voie de sécrétion impliquant le trafic RE-Golgi étant considérée comme conventionnelle, toutes les voies de sécrétion qui en diffèrent sont dites non conventionnelles. De manière intéressante, beaucoup de ces dernières ne sont pas constitutives mais sont déclenchées par des stress cellulaires. Par exemple, la sécrétion du *Fibroblast Growth Factor-1* (FGF-1) est induite par le choc thermique (Prudovsky et al., 2002). La carence en azote induit la sécrétion de l'*Acyl coenzyme A (CoA) binding protein* (AcbA) chez l'amibe *D. discoideum* (Kinseth et al., 2007) et son homologue Abc1 chez les levures *S. cerevisiae* et *P. pastoris* (Duran et al., 2010; Manjithaya et al., 2010), qui sont nécessaires à la sporulation des deux organismes. L'inflammation induit la sécrétion des cytokines IL-1 β et IL-18 ainsi que l'alarmine *High Mobility Group Box 1 protein* (HMGB1) (Dupont et al., 2011). Le stress mécanique survenant dans l'épithélium folliculaire de la drosophile à un stade de développement précis induit le dépôt de l'intégrine α PS1 à la membrane basolatérale (Schotman et al., 2008). L'acheminement du mutant Δ F508 de la protéine transmembranaire *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (CFTR) vers la membrane apicale n'a lieu qu'en cas du stress du RE (Gee et al., 2011). Tous ces exemples soulignent le fait que des conditions de stress peuvent activer des machineries qui permettent la sécrétion non conventionnelle de cargos spécifiques.

La majorité des protéines sécrétées de manière non conventionnelle sont dépourvues de peptide signal et sont donc solubles dans le cytoplasme. Leur sécrétion ne passe ni par le RE, ni par l'appareil de Golgi. Il existe de rares exemples de protéines transmembranaires, synthétisées dans le RE, qui atteignent la membrane plasmique sans passer par l'appareil de Golgi. Plusieurs exemples de protéines sécrétées de manière non conventionnelle sont présentés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Liste non exhaustive de cargos sécrétés de manière non conventionnelle

Cargos		Transport non vésiculaire	Transport vésiculaire
Protéines cytosoliques	Facteur MAT α (<i>S.Cerevisiae</i>)	Transporteur ABC (Kuchler et al., 1989)	
	FGF-1 FGF-2	Franchissement direct de la membrane plasmique (Prudovsky et al., 2002; Ebert et al., 2010)	
	Tat (VIH-1)	Franchissement direct de la membrane plasmique (Chang et al., 1997)	
	Galectine-1 Galectine-3	Ectocytose (Cooper and Barondes, 1990; Mehul and Hughes, 1997)	
	Acb1 (<i>S.Cerevisiae</i> et <i>P.pastoris</i>) AcbA (<i>D.Discoideum</i>)		Implication de GRASP et de l'autophagie (Duran et al., 2010; Manjithaya et al., 2010; Kinseth et al., 2007)
	IL-18		Implication de GRASP et de l'autophagie (Dupont et al., 2011)
	HMGB1		Implication de GRASP et de l'autophagie (Dupont et al., 2011)
	IL1- β		Implication de GRASP et de l'autophagie (Dupont et al., 2011) Sécrétion par les lysosomes (Andrei et al., 1999)
Protéines transmembranaires	Intégrine α PS1 (<i>D.melanogaster</i>)		Implication de GRASP (Schotman et al., 2008)
	Δ F508-CFTR		Implication de GRASP et de l'autophagie (Gee et al., 2011)

2.2.1. Différentes voies de sécrétion non conventionnelles

Certains cargos cytosoliques sont sécrétés sans passer par aucun compartiment endomembranaire. Ils peuvent traverser directement la membrane plasmique avec ou sans l'assistance d'un transporteur protéique à la membrane (**Fig 11, voie b**). D'autres sont transportés hors de la cellule dans des vésicules qui bourgeonnent directement de la membrane plasmique (processus d'ectocytose) (**Fig 11, voie d**).

Les autres cargos cytosoliques sont sécrétés de manière non conventionnelle par l'intermédiaire de vésicules de transport, qui sont d'ailleurs définies différemment par rapport aux vésicules utilisées dans la voie conventionnelle. En effet, dans la sécrétion conventionnelle, le RE, l'ERGIC et l'appareil de Golgi sont considérés comme des compartiments stationnaires par rapport aux vésicules à manteau qui en bourgeonnent, d'où la

notion de compartiment *versus* vésicules. Dans la sécrétion non conventionnelle qui ne passe ni par le RE ni par l'appareil de Golgi, la notion de vésicules de transport désigne toutes les structures endomembranaires qui peuvent contenir des cargos. De manière générale, la sécrétion non conventionnelle requiert les machineries impliquées (i) dans la formation des autophagosomes, (ii) dans la génération de corps multivésiculaires (MVB) à partir d'endosomes, et (iii) dans les événements de fusion au niveau des endosomes (Duran et al., 2010; Manjithaya et al., 2010; Bruns et al., 2011; Dupont et al., 2011; Gee et al., 2011). Ceci suggère que les autophagosomes, les endosomes et MVB, ainsi que les amphisomes issus de la fusion autophagosome-endosome, sont tous de potentiels transporteurs des cargos en question. Cependant, le trajet emprunté par ces cargos n'est pas bien défini et reste pour l'instant hypothétique.

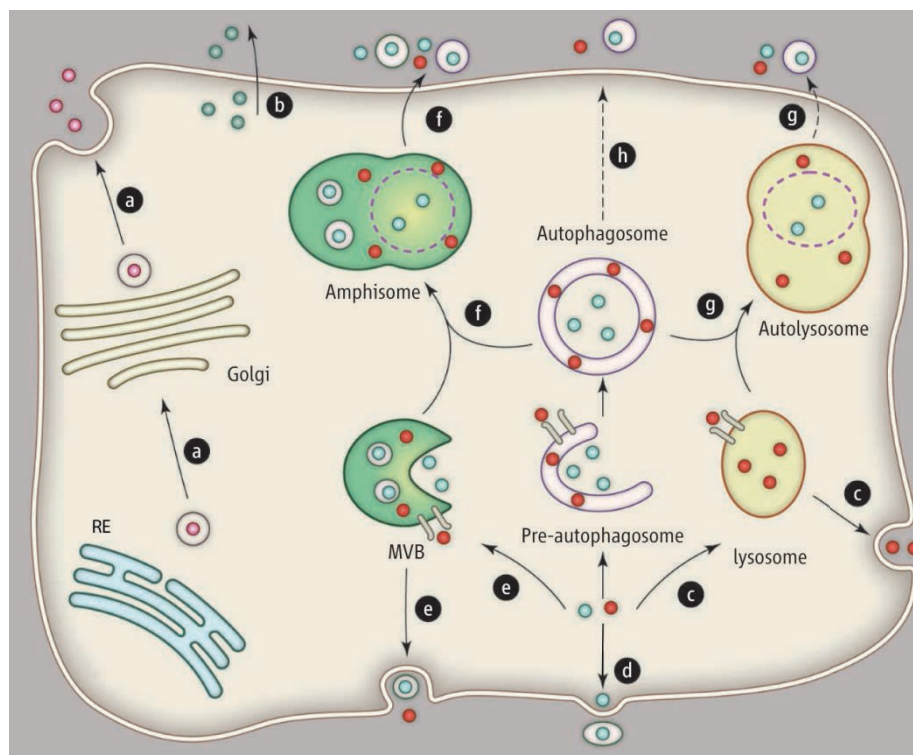


Figure 11. Différentes voies de sécrétion des protéines (adapté de Zhang and Schekman, 2013)

a. La voie de sécrétion conventionnelle impliquant le RE et l'appareil de Golgi. **b-h.** Les voies de sécrétion non conventionnelles. Les points rouges représentent les cargos internalisés dans une vésicule de transport par franchissement de sa membrane. Les points bleus représentent les cargos internalisés dans une vésicule de transport par invagination de sa membrane ou les cargos séquestrés dans un autophagosome.

Deux raisons rendent difficile la caractérisation des voies de sécrétion non conventionnelle. (1) D'une part, les mécanismes par lesquels les cargos non conventionnels entrent dans un compartiment endomembranaire, et de ce fait rejoignent la voie sécrétoire, restent inconnus. Une protéine cytosolique peut entrer dans un compartiment endomembranaire soit *via* un canal protéique, soit par invagination de la membrane du compartiment en question, soit par sa séquestration dans une structure pré-autophagosomale (ou phagophore) qui formera ensuite l'autophagosome (*cf* §4.2 p66). Les exemples actuellement connus de sécrétion non conventionnelle ne fournissent pas d'information, ni sur le premier compartiment endomembranaire qui internaliserait le cargo (le site d'entrée du cargo dans la voie sécrétoire), ni sur les mécanismes qui confèreraient une spécificité à cette internalisation. (2) D'autre part, la caractérisation du trafic non conventionnel d'un cargo est rendue complexe car les compartiments endomembranaires sont dynamiques, fusionnant entre eux et avec la membrane plasmique. Par exemple, après son internalisation dans un endosome, un lysosome ou un autophagosome, le cargo peut être délivré directement à la membrane plasmique (**Fig 11, voies e, c et h**). Le cargo peut aussi passer par un compartiment « hybride » issu de la fusion de deux compartiments endomembranaires qui va à son tour fusionner avec la membrane plasmique. Ces compartiments « hybrides » peuvent être des amphisomes ou des autolysosomes, issus de la fusion entre un autophagosome avec un endosome ou un lysosome, respectivement. (**Fig 11, voies f et g**).

Les cargos non conventionnels semblent emprunter préférentiellement les autophagosomes et les amphisomes pour atteindre la membrane plasmique, alors que la sécrétion à partir des lysosomes serait restreinte à des cargos spécifiques résistants aux conditions protéolytiques des lysosomes (Andrei et al., 1999). Même s'il n'est pas directement prouvé que les autophagosomes soient des transporteurs de cargos, il est de plus en plus admis que la machinerie autophagique est impliquée dans les voies de sécrétion non conventionnelles (références dans le **Tableau 2**). Un autre point commun émerge des différents exemples de sécrétion non conventionnelle. Il s'agit de l'implication des protéines GRASP, connues paradoxalement pour leur rôle dans le maintien de la structure de l'appareil de Golgi (Giuliani et al., 2011). Le fait que ces deux phénomènes soient souvent observés en parallèle laisse penser qu'ils feraient partie d'un même mécanisme de sécrétion non conventionnelle, le mécanisme *GRASP and Autophagy-Dependent* (GAD). Ce mécanisme concerne non seulement des protéines cytosoliques, mais aussi les protéines transmembranaires (*cf* **Tableau 2**).

2.2.2. Implication de la machinerie autophagique dans la sécrétion non conventionnelle

De manière intéressante, la machinerie autophagique impliquée dans la sécrétion non conventionnelle concerne des protéines requises pour la formation de l'autophagosome et pour la fusion avec les endosomes, mais pas celles requises pour la fusion avec les lysosomes (Duran et al., 2010; Manjithaya et al., 2010; Gee et al., 2011). A partir de cette observation, deux modèles non exclusifs de sécrétion non conventionnelle médiée par les autophagosomes ont été proposés. Dans le premier modèle, l'autophagosome contenant le cargo fusionne directement avec la membrane plasmique (**Fig 11, voie h**). Dans le deuxième, l'autophagosome fusionne d'abord avec les endosomes ou les MVB, donnant les amphisomes qui vont ensuite fusionner avec la membrane plasmique (**Fig 11, voie f**).

Si ces deux modèles sont exacts, il reste à expliquer pourquoi les autophagosomes qui transportent les cargos ne fusionnent pas avec les lysosomes? S'agirait-il d'un type distinct d'autophagosomes? Bruns et collègues ont suggéré que les autophagosomes impliqués dans la sécrétion non conventionnelle de l'Abc1 chez *S. cerevisiae* constitueraient un type spécifique d'autophagosomes que les auteurs ont appelé « autophagosomes sécrétoires ». Malgré certains acteurs communs, la formation des autophagosomes sécrétoires semble être distincte de celle des autophagosomes de dégradation (Bruns et al., 2011). Ainsi, le pivot de l'autophagie entre son rôle dans la sécrétion non conventionnelle et son rôle dans la dégradation doit reposer sur une régulation fine de la machinerie autophagique, tant au niveau de la formation de l'autophagosome qu'au niveau des événements de fusion vésiculaire.

2.2.3. Implication des protéines GRASP dans la sécrétion non conventionnelle

Les protéines GRASP (GRASP65 et GRASP55 chez les mammifères) ont été initialement identifiées comme protéines d'échafaudage qui maintiennent l'empilement des citernes golgiennes (Barr et al., 1997; Shorter, 1999). GRASP possède deux domaines PSD95/Dlg1/ZO-1 (PDZ) conservés (Kinseth et al., 2007). Les domaines PDZ sont des domaines d'interaction protéine-protéine, interagissant avec des motifs appelés « ligands du domaine PDZ » (Ye and Zhang, 2013). La localisation de GRASP à la membrane des citernes golgiennes repose sur : (i) l'interaction avec des protéines golgiennes comme par exemple GM130, via le domaine PDZ2 en C-terminale (Barr et al., 1997; Short et al., 2001), et (ii) une ancre lipidique en N-terminal (Bachert and Linstedt, 2010) (**Fig 12A**). Ce double ancrage de GRASP permet d'orienter la protéine de manière à favoriser une interaction en *trans* entre les protéines GRASP sur les deux membranes opposées (trans-oligomérisation). La trans-oligomérisation de GRASP impliquerait les deux domaines PDZ, selon un modèle dans lequel

le domaine PDZ2 d'une molécule fournit le « ligand » qui se lie au domaine PDZ1 de la molécule sur la membrane opposée (**Fig 12A**). Ce serait par ce mécanisme que GRASP maintiendrait l'empilement des citernes golgiennes (Sengupta et al., 2009; Bachert and Linstedt, 2010).

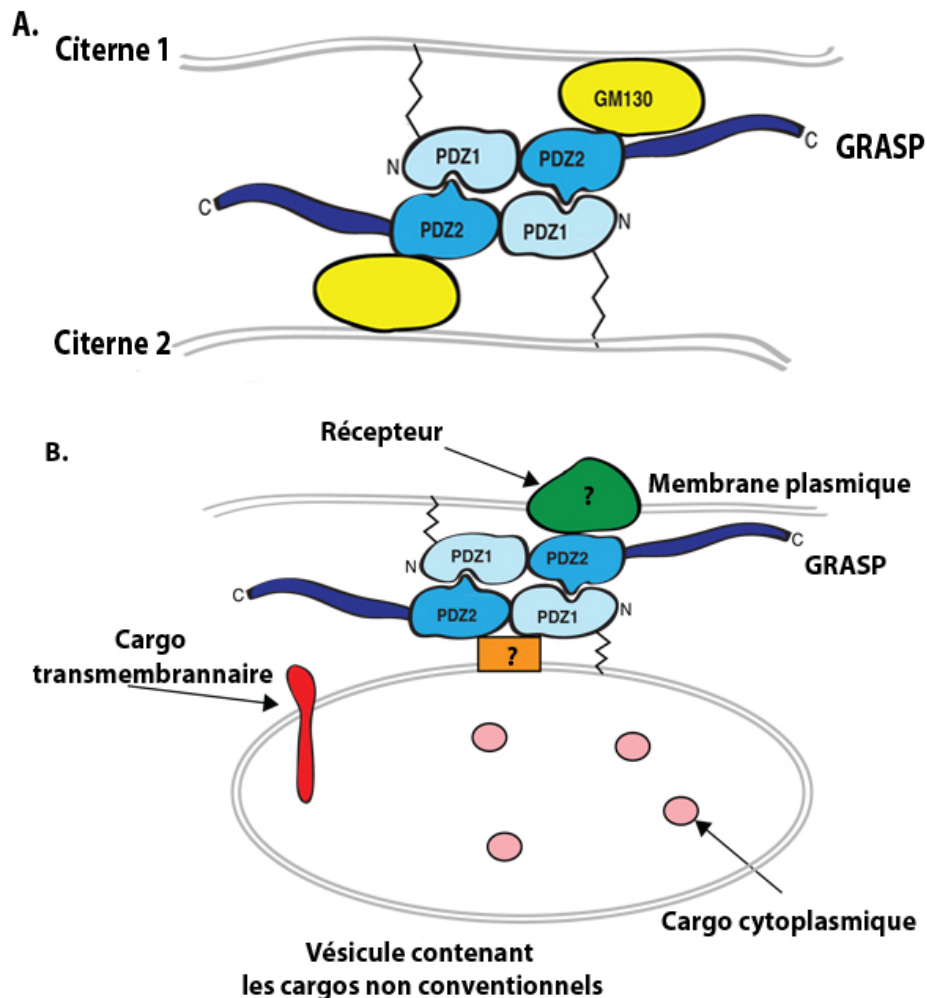


Figure 12. Modèle d'arrimage de deux membranes grâce à la trans-oligomérisation de GRASP (adapté de Giuliani, 2011)

A. Modèle de trans-oligomérisation de GRASP (*en bleu*), permettant le maintien de l'empilement des citernes golgiennes. La protéine golgienne GM130 (*en jaune*) joue le rôle de récepteur de GRASP au niveau de la membrane des citernes golgiennes.

B. Modèle hypothétique du rôle de GRASP dans la sécrétion non conventionnelle en tant que protéine permettant l'arrimage du transporteur de cargos avec la membrane plasmique. Les récepteurs équivalents à GM130 sont inconnus (*protéines en vert et orange*).

Dans la sécrétion non conventionnelle, GRASP pourrait jouer un rôle similaire à son rôle d'échafaudage décrit dans l'appareil de Golgi, c'est-à-dire intervenir en tant que protéine d'arrimage, permettant l'attachement des transporteurs de cargos avec la membrane

plasmique ou celle d'un compartiment intermédiaire sur le trajet vers la membrane plasmique (Giuliani et al., 2011). Ce rôle potentiel de GRASP correspondrait au changement de localisation intracellulaire de cette protéine observé dans les conditions d'induction des voies non conventionnelles de sécrétion (Dupont et al., 2011), dont une localisation membranaire observée lors de la sécrétion de l'intégrine α PS1 chez la drosophile (Schotman et al., 2008). L'arrimage pourrait se faire par la trans-oligomérisation de deux protéines GRASP sur les deux membranes opposées via leurs domaines PDZ (**Fig 12B**), ou par l'interaction de GRASP avec une autre protéine d'arrimage. De ce point de vue, il est intéressant de noter que, dans les cellules épithéliales, les protéines à domaines PDZ sont retrouvées au niveau des jonctions serrées, à proximité du pôle apical (Fanning et al., 1998). Il serait envisageable que GRASP permette un trafic polarisé de certains cargos de la voie de sécrétion non conventionnelle.

Alternativement, GRASP pourrait ne pas être impliqué directement en tant qu'élément présent sur les vésicules qui contiennent les cargos de la voie non conventionnelle. Selon un modèle proposé par Malhotra, concernant la sécrétion d'Acb1 chez la levure, GRASP permettrait de générer une structure membranaire nécessaire à la formation de vésicules de trafic non conventionnel, sans forcément être présent sur ces vésicules de transport (Malhotra, 2013). Par ailleurs, une autre possibilité serait que GRASP soit requis non pas pour le trafic du cargo proprement dit, mais pour le trafic de la machinerie d'arrimage/de fusion qui sert à la sécrétion non conventionnelle du cargo, cette machinerie pouvant tout à fait suivre un trafic conventionnel (Levi and Glick, 2007). En effet, même si de manière générale GRASP n'est pas indispensable à la sécrétion conventionnelle (Vinke et al., 2011), certaines protéines spécifiques, comme le TGF- α ou Frizzled-4, suivent un trafic conventionnel qui dépend de GRASP (Kuo, 2000; D'Angelo et al., 2009).

A côté de la voie conventionnelle de sécrétion qui débute dans le RE et qui se poursuit vers l'appareil de Golgi, les cellules eucaryotes utilisent de multiples voies alternatives pour délivrer des protéines solubles et membranaires à la surface cellulaire. Généralement, les cargos suivant ces voies non conventionnelles ne sont pas sécrétés de manière constitutive, mais en situation de stress cellulaire. Toutes les voies de sécrétion non conventionnelles contournent l'appareil de Golgi mais en suivant des mécanismes très différents. Si certains cargos peuvent franchir directement la membrane plasmique, d'autres utilisent des transporteurs vésiculaires. Dans ces derniers cas, la caractérisation du trafic des cargos est rendue difficile par la complexité et la dynamique du système endomembranaire. Malgré cela, un mécanisme potentiel commun de sécrétion non conventionnelle est défini par l'implication de la machinerie autophagique et des protéines GRASP.

Chapitre III : Stress du RE et UPR

Nous avons vu dans le chapitre I que l'une des fonctions fondamentales du RE est la synthèse et le repliement des protéines qui y sont synthétisées. L'exécution de cette fonction est le reflet d'une bonne homéostasie du RE dans la mesure où le repliement correct des protéines dépend de l'intégration de nombreux paramètres tels que : le niveau d'ATP et la concentration intra-réticulaire en Ca^{2+} (nécessaires au fonctionnement des chaperonnes et enzymes de repliement), le niveau de glucose (nécessaire à la N-glycosylation des protéines), l'environnement oxydant (nécessaire à la formation des ponts disulfures).

Le stress du RE est déclenché quand cette homéostasie est perturbée. Ce stress se matérialise par une accumulation de protéines mal/non repliées dans ce compartiment, qui est détectée, chez les mammifères, par le domaine luminal de trois protéines transmembranaires du RE : l'*Inositol-requiring enzyme 1* (IRE1), la *PKR-like ER kinase* (PERK) et l'*Activating transcription factor 6* (ATF6). Via leur domaine cytoplasmique, ces trois protéines déclenchent trois voies de signalisation regroupées sous le terme d'UPR, qui constitue la réponse cellulaire spécifique au stress du RE.

L'UPR permet de résoudre le stress du RE par trois moyens : (i) la diminution de la charge protéique entrant dans le RE, (ii) le renforcement des machineries de repliement et de contrôle qualité des protéines et (iii) l'augmentation de la dégradation des protéines mal/non repliées par la voie ERAD et par l'autophagie. Si le stress du RE reste insurmontable, l'UPR conduit à l'induction de l'apoptose.

Dans le contexte d'une infection virale, la synthèse de protéines virales et/ou l'assemblage de particules virales dans le RE peuvent provoquer le stress du RE et induire l'UPR. Comme toute réponse cellulaire, l'UPR est modulée par de nombreux virus le plus souvent dans le but d'optimiser leur cycle répliatif.

3.1. Détection du stress du RE par IRE1, PERK et ATF6

IRE1, PERK et ATF6 sont trois protéines transmembranaires du RE qui possèdent un domaine luminal qui détecte le stress du RE (concrétisé par l'accumulation de protéines mal/non repliées) et un ou plusieurs domaines cytoplasmiques qui initient les cascades de signalisation de l'UPR. Ces trois protéines, senseurs du stress du RE, permettent ainsi de relayer l'information sur l'état de repliement des protéines dans le RE vers le cytoplasme et le noyau pour réguler la machinerie de traduction et le profil d'expression des gènes. A la différence des mammifères, la levure ne possède qu'un seul senseur de stress du RE, Ire1p,

qui gouverne la seule voie de signalisation de l'UPR chez cet organisme. De par sa conservation de la levure jusqu'à l'homme, la voie IRE1 est de loin la plus étudiée.

Avant d'aborder les cascades de signalisation initiées par IRE1, PERK et ATF6, cette partie traitera la question concernant la toute première étape de l'UPR : comment les senseurs sont-ils activés par l'accumulation de protéines mal/non repliées dans le RE ?

3.1.1. Activation d'IRE1 et de PERK

IRE1 et PERK se ressemblent en ce qui concerne leur organisation en domaines fonctionnels. Les domaines luminaux de ces deux senseurs sont d'ailleurs expérimentalement interchangeables (Bertolotti et al., 2000). La partie cytoplasmique d'IRE1 comprend un domaine kinase et un domaine à activité endoribonucléase (Tirasophon et al., 1998; Haze et al., 1999). PERK possède un domaine cytoplasmique à activité sérine/thréonine kinase, similaire au domaine kinase de la *Protein Kinase R* (PKR) (Harding et al., 1999).

L'activation d'IRE1 implique plusieurs événements : dimérisation, oligomérisation et trans-phosphorylation, ce qui induit des changements conformationnels permettant d'activer son domaine endonucléase. Le mécanisme d'activation de PERK est similaire à celui d'IRE1 dans le sens où il implique dimérisation et trans-phosphorylation (Gardner et al., 2013; Taouji et al., 2013).

Concernant les mécanismes par lesquels les domaines luminaux d'IRE1 et de PERK détectent les protéines mal/non repliées, deux modèles non exclusifs sont actuellement proposés : un mécanisme indirect via l'intermédiaire de la chaperonne réticulaire BiP et un mécanisme direct par la liaison des protéines mal/non repliées (**Fig 13A**).

Détection des protéines mal/non repliées via l'intermédiaire de la chaperonne BiP

Il a été montré que IRE1 et PERK sont associés à la chaperonne réticulaire BiP dans les conditions normales, mais que BiP se dissocie des senseurs dans les conditions où le repliement des protéines est perturbé (conditions de stress du RE) (Bertolotti et al., 2000; Okamura et al., 2000). Ainsi, il a été proposé un premier modèle d'activation des senseurs qui implique des interactions compétitives entre le domaine luminal des senseurs, BiP et les protéines mal/non repliées. La liaison de BiP aux domaines luminaux d'IRE1 et de PERK les maintient inactifs en les empêchant de former des structures dimériques et oligomériques. Quand les protéines mal/non repliées s'accumulent en quantité importante dans le RE, elles se lient de manière compétitive à BiP. Cette dernière se dissocie ainsi d'IRE1 et de PERK, ce qui permet leur activation (Bertolotti et al., 2000; Ma et al., 2002).

Détection directe des protéines mal/non repliées

Les études chez la levure ont montré que BiP n'était pas le seul régulateur d'Ire1p et que les protéines mal/non repliées pouvaient être des ligands directs activant le senseur (Kimata et al., 2004; Gardner and Walter, 2011). Notamment, la structure d'un dimère d'Ire1p présente un sillon partagé par les deux monomères, où pourrait se positionner un peptide, de façon similaire au sillon du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) (Credle et al., 2005; Gardner and Walter, 2011) (**Fig 13B**). Ire1p serait activé en deux étapes : la dissociation de BiP permet sa dimérisation, puis la liaison des protéines mal/non repliées au niveau du sillon formé par le dimère d'Ire1p permet son activation par oligomérisation (Kimata et al., 2007).

Cependant, ce modèle reste en débat pour les senseurs de stress du RE des mammifères. En effet, il est peu probable que le sillon formé par le dimère d'IRE1 des mammifères puisse loger un peptide, étant donné sa taille étroite et l'enfouissement de certains résidus critiques (Zhou et al., 2006) (**Fig 13B**). D'ailleurs, une étude a montré que l'activation d'IRE1 ne dépend que de la dissociation de BiP (Oikawa et al., 2009).

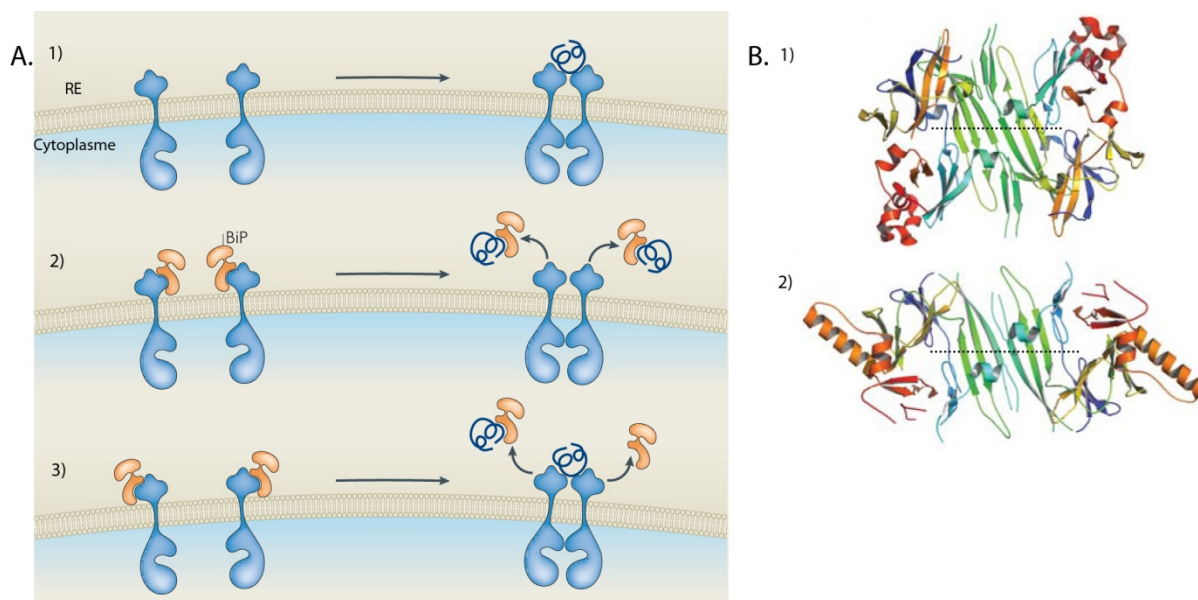


Figure 13. Modèles proposés pour l'activation d'IRE1 (adapté de Ron and Walter, 2007 et de Gardner and Walter, 2011)

A. Trois modèles d'activation d'IRE1 : activation directe par la liaison des protéines mal/non repliées (1), activation indirecte par la dissociation de la chaperonne BiP (2) et le modèle « hybride » (3) des modèles (1) et (2). Les structures oligomériques d'IRE1 ne sont pas montrées.

B. Structure de la partie luminale d'un dimère d'Ire1p (*S. cerevisiae*) (1) et d'IRE1 (*H. sapiens*) (2). Chaque monomère est coloré de rouge à bleu, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. L'interface de dimérisation est composée de feuillets β qui forment le « plancher » du potentiel sillon de liaison des peptides (la position d'un éventuel peptide dans le sillon est représentée par la ligne en pointillé). Dans le cas d'IRE1 (2), les hélices α forment des « parois » qui limitent la longueur du sillon.

3.1.2. Activation d'ATF6

L'activation du troisième senseur suit un mécanisme très différent. La dissociation de BiP du domaine luminal d'ATF6 démasque son signal d'adressage à l'appareil de Golgi et permet son trafic vers celui-ci dans des vésicules COPII (Shen et al., 2002; Nakanaka et al., 2004). La partie cytoplasmique d'ATF6 est ensuite clivée par deux enzymes résidentes de l'appareil de Golgi, Site-1 protease (S1P) et Site-2 protease (S2P) (Ye et al., 2000), libérant un fragment de 50 kDa. Ce fragment d'ATF6 est appelé p50ATF6 pour le distinguer de la protéine entière de 90 kDa aussi appelée p90ATF6. p50ATF6 est un facteur de transcription de type *basic leucine zipper* (bZip) dont la principale cible est constituée de gènes codant pour les chaperonnes et enzymes de repliement dans le RE (Yoshida et al., 1998; Haze et al., 1999).

Dans les conditions normales, ATF6 existe dans la membrane du RE sous forme de monomère mais aussi de dimère ou d'oligomère, grâce à la formation de ponts disulfures intermoléculaires (Nakanaka et al., 2007). Il a été montré que la forme d'ATF6 transportée vers l'appareil de Golgi était monomérique, dont les ponts disulfures ont été réduits, et hypoglycosylée (Nakanaka et al., 2007; Hong et al., 2004). Il a ainsi été suggéré que les perturbations dans la formation des ponts disulfures ou dans la glycosylation des protéines, qui sont des inducteurs du stress du RE, peuvent être directement détectés par ATF6 *via* l'état de ses propres ponts disulfures (intra et intermoléculaires) et son propre statut de glycosylation, respectivement.

En résumé, les trois senseurs de stress du RE IRE1, PERK et ATF6 partagent un même régulateur, la chaperonne réticulaire BiP. Malgré la remise en question d'une activation directe d'IRE1 et de PERK, et éventuellement d'ATF6 par les protéines mal/non repliées, il est admis que BiP ne peut pas être le seul régulateur de l'activation des senseurs. En effet, il a été montré que non seulement la cinétique mais également l'ordre d'activation des trois senseurs dépend de l'agent inducteur du stress du RE. L'activation sélective des senseurs ne peut pas reposer uniquement sur des affinités différentes entre BiP et chaque senseur, car

sinon quel que soit l'agent inducteur de stress, l'ordre d'activation des senseurs serait le même (DuRose, 2006).

3.2. Signalisation initiée par les trois voies de l'UPR

Suite à leur activation, les trois senseurs initient des cascades de signalisation qui conduisent (i) à la régulation de la charge protéique dans le RE, (ii) à l'activation de facteurs de transcription spécifiques qui vont réguler l'expression d'un ensemble de gènes cibles de l'UPR et (iii) à l'activation de voies de signalisation dont certaines ne sont pas spécifiques de l'UPR, mais qui contribuent à réguler la balance survie-apoptose (**Fig 14**).

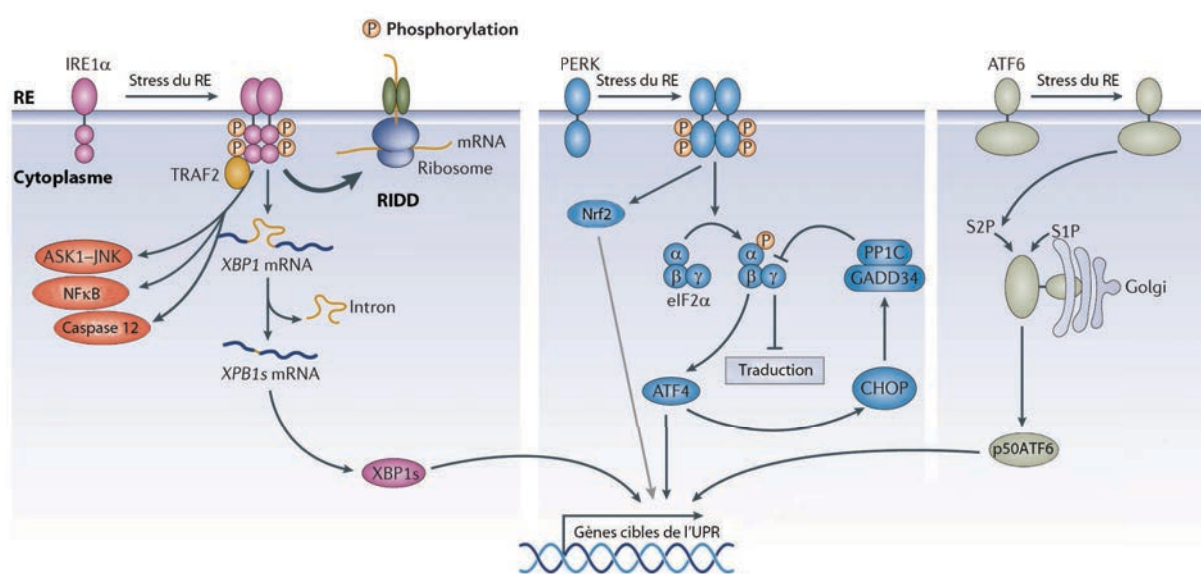


Figure 14. Les trois voies de l'UPR (adapté de Hetz et al., 2013)

3.2.1 Voie IRE1

Épissage de l'ARNm codant pour XBP1

Le domaine endonucléase d'IRE1, une fois activé, est responsable de l'épissage dans le cytoplasme de l'ARNm codant pour la *X-box binding protein-1* (XBP1), homologue de Hac1 chez la levure (Yoshida et al., 2001a). Ce processus enlève un intron de 26 nucléotides et les deux extrémités de l'ARNm *XPB1* épissé sont ensuite reliées par une ligase. Contrairement à la levure dont l'ARNm *Hac1* non épissé n'est pas traduit (Rüegsegger et al., 2001), les deux formes de l'ARNm *XPB1* sont traduites, donnant deux formes de la protéine XBP1 : pXBP1(U) et pXBP1(S), issues des ARNm non épissé et épissé, respectivement. En raison du décalage du cadre de lecture engendré par l'épissage, ces deux protéines diffèrent

dans leur séquence d'acides aminés. Seule la forme pXBP1(S) est un facteur de transcription actif de type bZIP (Yoshida et al., 2001a), qui promeut la transcription des gènes codant pour les chaperonnes réticulaires et les composants du système ERAD (cf §3.3.3 p57). La protéine pXBP1(U), quant à elle, est un régulateur négatif de pXBP1(S) car le complexe pXBP1(U)-pXBP1(S) est dégradé dans le protéasome (Yoshida et al., 2006). Sauf mention contraire, XBP1 fait référence à la forme transcriptionnellement active pXBP1(S).

Activité RIDD

Outre l'ARNm *XBP1*, IRE1 dégrade un ensemble d'ARNm de manière séquence spécifique, ce qui contribue à diminuer l'influx peptidique dans le RE. Cette activité d'IRE1, appelée *IRE1-dependent mRNA decay* (RIDD), est indépendante de l'épissage de l'ARNm *XBP1* (Hollien et al., 2009; Oikawa et al., 2010). Les mécanismes qui régulent différenciellement ces deux activités de IRE1 ne sont pas encore bien décrits (Maurel et al., 2014).

Activation d'autres voies de signalisation

La phosphorylation du domaine cytoplasmique d'IRE1 permet le recrutement des protéines adaptatrices spécifiques pour induire l'activation des protéines de la famille des *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) telles que l'*Extracellular signal-regulated kinase* (ERK), la *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) et la *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38^{MAPK}) (Nguyen, 2004). La cascade d'activation la mieux caractérisée est celle impliquant la protéine adaptatrice *TNF receptor-associated factor 2* (TRAF2), qui active ensuite l'*Apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1), menant à l'activation de JNK (Urano et al., 2000).

Le recrutement de TRAF2 au domaine cytoplasmique d'IRE1 joue également un rôle dans l'activation du facteur de transcription *Nuclear factor-kappa B* (NF-κB) selon un mécanisme pour l'instant mal caractérisé (Kaneko et al., 2003; Tam et al., 2012).

La signalisation via les MAPK ou NF-κB n'est pas spécifique de l'UPR mais contribue à déterminer le devenir de la cellule en cas de stress du RE : survie ou apoptose (Darling and Cook).

Activation de la Caspase-12

Toujours *via* TRAF2, la voie IRE1 active la Caspase-12 localisée à la membrane du RE. Ceci constitue l'un des mécanismes par lesquels l'UPR induit l'apoptose en cas de stress du RE insurmontable (Yoneda et al., 2001).

3.2.2. Voie PERK

Inhibition générale de la traduction

Par l'activité de son domaine kinase, PERK activé phosphoryle la sous unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2 (eIF2 α) au niveau de la Ser 51 (Harding et al., 1999). Le facteur eIF2 α phosphorylé (P-eIF2 α) inhibe la formation du complexe ternaire (eIF2-GTP-tRNA_{initiateur} chargé) et inhibe ainsi l'initiation de la traduction, permettant d'alléger rapidement la charge protéique dans le RE.

Activation des facteurs de transcription ATF4 et CHOP

Tandis que la traduction est globalement inhibée suite à la phosphorylation de eIF2 α , l'ARNm codant pour l'*Activating Transcription Factor 4* (ATF4) est, au contraire, préférentiellement traduit (Harding et al., 2000), grâce à des éléments régulateurs particuliers en amont de la région codante (Lu, 2004). ATF4 est un facteur de transcription dont les gènes cibles sont impliqués dans une large gamme de fonctions, comprenant, entre autre, le transport et la synthèse des acides aminés, la réponse au stress oxydant et l'apoptose (Harding et al., 2003; Ameri and Harris, 2008).

L'un des gènes activés par ATF4 est celui codant pour la *C/EBP homologous protein* (CHOP), aussi nommé *Growth arrest and DNA damage-inducible gene 153* (GADD153) (Harding et al., 2000). Comme l'ARNm *ATF4*, l'ARNm *CHOP* est aussi traduit préférentiellement en présence d'une quantité importante de P-eIF2 α (Palam et al., 2011). CHOP est un facteur de transcription et un acteur majeur de l'induction de l'apoptose si le stress du RE ne peut être résolu par la cellule, en induisant l'expression de certaines protéines pro-apoptotiques et en réprimant celle de la protéine anti-apoptotique *B cell lymphoma 2* (Bcl-2) (Oyadomari and Mori, 2004). Bien que les voies IRE1 et ATF6 induisent aussi l'expression de CHOP, cela reste essentiellement dépendant de la voie PERK (Harding et al., 1999; Yoshida et al., 2000).

Il est à noter que la cascade eIF2 α / ATF4 / CHOP décrite ci-dessus, qui conduit à une inhibition globale de la traduction et à l'expression d'un ensemble de gènes cibles, n'est pas

spécifique de l'UPR. En effet, la phosphorylation d'eIF2 α peut également être induite par l'activation d'autres kinases telles que la *General Control Non-derepressible 2* (GCN2) en cas de carence en acides aminés, la *Protein Kinase R* (PKR) suite à la détection d'ARN double brin viral ou l'*Heme Regulated Inhibitor* (HRI) en cas de stress oxydant ou stress thermique (Proud, 2005). C'est pourquoi les événements consécutifs à l'activation de P-eIF2 α et d'ATF4 sont rassemblés sous l'appellation de réponse cellulaire intégrée ou *Integrated Stress Response* (ISR).

Coordination entre l'inhibition générale de la traduction par P-eIF2 α et l'expression des gènes cibles de l'UPR

L'inhibition générale de la traduction induite par la voie PERK via P-eIF2 α , qui permet d'alléger la charge protéique dans le RE, est régulée temporellement de sorte à ne pas empêcher la traduction des gènes cibles de l'UPR. En effet, une boucle de rétrocontrôle négatif conduit à la déphosphorylation de eIF2 α et la reprise de la traduction (**Fig 15**). ATF4 active la transcription du gène codant pour la protéine *Growth arrest and DNA damage-inducible gene 34* (GADD34), qui forme un complexe avec la *Protein phosphatase 1C* (PP1C) pour déphosphoryler eIF2 α (Novoa et al., 2001; Ma and Hendershot, 2003). Par ailleurs, eIF2 α est aussi déphosphorylé par le complexe formé de la protéine *Constitutive Repressor of eIF2 α Phosphorylation* (CReP) et de la PP1C. Si l'expression de GADD34 est inductible, la CReP, elle, est exprimée de manière constitutive (Jousse, 2003).

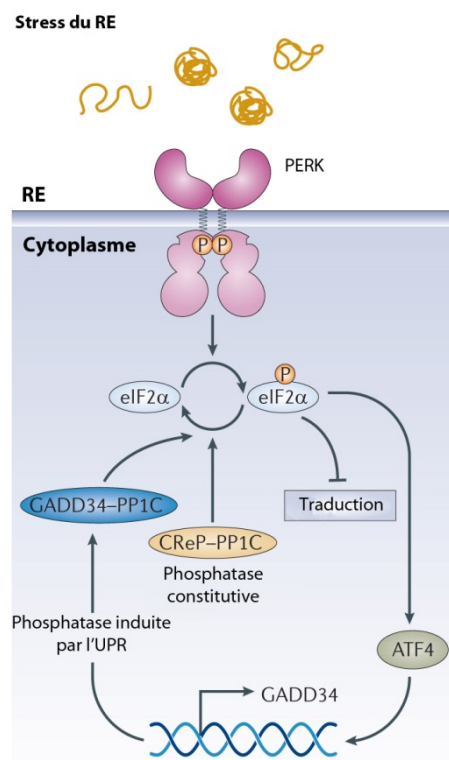


Figure 15. Régulation de la phosphorylation d'eIF2α au cours de l'UPR (Hetz et al., 2013)

Activation d'autres voies de signalisation

Le facteur de transcription *NF-E2-related factor 2* (Nrf2) fait partie des facteurs de transcription de la réponse au stress oxydant et peut être phosphorylé et activé par PERK (Cullinan et al., 2003). *Via* Nrf2, l'UPR est associée à la réponse au stress oxydant, qui permet de limiter l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées lors du stress du RE (Cullinan and Diehl, 2006). Parmi les gènes activés par Nrf2 se trouvent ceux codant pour les sous-unités du protéasome (Kwak et al., 2003). L'augmentation de l'activité du protéasome est importante pour assurer la dégradation des protéines mal/non repliées dans le RE *via* le système ERAD (Lee et al., 2012).

La voie PERK contribue également à l'activation de NF-κB, qui est normalement maintenu inactif dans le cytoplasme par la liaison à son inhibiteur *Inhibitor κB*. L'arrêt général de la traduction induit par P-eIF2α conduit à une diminution de l'expression de IκB car cette protéine a une demi-vie courte (Deng et al., 2004), ce qui permet l'activation de NF-κB et sa translocation nucléaire.

3.2.3. Voie ATF6

L'effecteur de la voie ATF6 est le domaine cytoplasmique de cette protéine elle-même, c'est-à-dire le facteur de transcription p50ATF6. Les gènes cibles de p50ATF6 sont principalement ceux qui codent pour les chaperonnes et enzymes de repliement (Yoshida et al., 2001a). p50ATF6 participe aussi, avec XBP1, à l'induction de la transcription de gènes codant pour certains acteurs de la voie ERAD (Yamamoto et al., 2007).

3.3. Impacts fonctionnels de l'UPR

Afin de résoudre le stress du RE, non seulement l'UPR allège le RE en limitant la charge protéique entrant dans ce compartiment, mais elle remodèle aussi considérablement le RE au niveau fonctionnel, principalement en renforçant les machineries de repliement, de contrôle qualité et de dégradation des protéines. L'action coordonnée des trois voies de l'UPR conditionne le devenir cellulaire : soit la cellule, en renforçant les fonctions du RE, s'adapte aux nouvelles conditions physiologiques ou pathologiques (c'est-à-dire qu'elle parvient à résoudre le stress du RE), soit elle ne parvient pas s'adapter et meurt par apoptose.

3.3.1. Diminution de la charge protéique entrant dans le RE

En cas de stress du RE, la phosphorylation d'eIF2 α constitue la première ligne de défense de la cellule pour limiter rapidement la charge protéique dans le RE de manière non spécifique par l'inhibition générale de la traduction. A côté de cela, l'activité RIDD d'IRE1 permet de limiter plus spécifiquement la quantité de protéines entrant dans le RE. En effet, la dégradation des ARNm par IRE1 ne concerne que des ARNm situés à proximité de la membrane du RE, ciblant ainsi ceux codant pour les protéines qui vont transloquer dans ce compartiment (Hollien et al., 2009; Oikawa et al., 2010).

3.3.2. Renforcement de la machinerie de repliement et de contrôle qualité des protéines dans le RE

Pour faire face à une surcharge protéique dans le RE, l'activation de l'UPR permet de renforcer les fonctions primordiales du RE : le repliement et le contrôle de qualité des protéines de la voie sécrétoire conventionnelle. L'augmentation de l'expression des chaperonnes et enzymes de repliement réticulaires est assurée par les facteurs de transcription XBP1 et p50ATF6. Ceux-ci se lient à la séquence consensus *ER stress response element* (ERSE) dans la région promotrice de ces gènes. Cet élément cis-régulateur, identifié initialement dans le promoteur des gènes codant pour BiP, GRP94 et CRT, est nécessaire à la

transcription accrue des chaperonnes réticulaires par XBP1 et p50ATF6 en cas de stress du RE (Yoshida et al., 1998, 2000, 2001a, 2001b).

3.3.3. Augmentation de la dégradation des protéines mal/non repliées par la voie ERAD

L'induction de l'UPR stimule l'activité ERAD d'abord en induisant l'expression des composants de la machinerie ERAD tels que EDEM1-3, Derlin1-3, Herp, HRD1, SEL1L (Oda, 2006). Par ailleurs, la protéine Herp (Ma and Hendershot, 2004), fortement induite par l'UPR, coordonne le recrutement des acteurs de la voie ERAD dans le sous-compartiment ERQC du RE, afin d'optimiser l'assemblage et le fonctionnement du complexe de rétro-translocation (Kondratyev et al., 2007; Leitman et al., 2014).

Il est important pour la cellule qu'une dégradation accrue des protéines dans le RE soit étroitement liée au renforcement du repliement et du contrôle qualité des protéines, afin d'éviter que celles en cours de repliement soient adressées par erreur à la dégradation. Les deux groupe de gènes, l'un codant pour les chaperonnes et enzymes de repliement et l'autre codant pour les acteurs de la voie ERAD, sont sous le contrôle de XBP1 et de p50ATF6 (Wang et al., 2000; Yoshida et al., 2001a; Yamamoto et al., 2004). XBP1 est principalement responsable de l'induction de l'expression des acteurs de la voie ERAD, tandis que p50ATF6 est plutôt responsable de l'induction de l'expression des acteurs du repliement/contrôle qualité (Yoshida et al., 2001a). Il est à noter que p50ATF6 exerce une régulation sur XBP1 par deux mécanismes. Premièrement, p50ATF6 stimule la transcription du gène codant pour XBP1 (Wang et al., 2000). Deuxièmement, la transcription optimale des gènes codant pour certains composants d'ERAD comme EDEM, HRD1 et Herp dépend à la fois de XBP1 et de p50ATF6 (Yamamoto et al., 2007). La régulation qu'exerce p50ATF6 sur XBP1 assure que l'expression des acteurs de la voie ERAD soit en adéquation avec celle des chaperonnes et enzymes de repliement.

3.3.4. Dégradation des portions du RE par l'autophagie

Il a été présenté dans la partie 1.4.2 (p31) du chapitre I que la réticulophagie (une forme spécifique de l'autophagie ciblant le RE) est, à côté de la voie ERAD, un mécanisme de dégradation des protéines mal/non repliées dans le RE. Cette forme d'autophagie est stimulée par l'UPR, par plusieurs mécanismes qui ciblent les différentes étapes de la formation des autophagosomes (Sano and Reed, 2013). Afin de faciliter la compréhension, les liens mécanistiques entre l'UPR et l'autophagie seront présentés ultérieurement dans la partie

4.3.4 (p77) du chapitre IV dédié à l'autophagie, après que les acteurs de l'autophagie aient été présentés.

Au cours de l'UPR, le RE subit une expansion pour s'adapter à une importante synthèse de protéines et pour répondre à la demande accrue en membrane imposée par l'activité sécrétoire. Cette expansion du RE repose sur XBP1, qui induit l'expression de gènes critiques dans la synthèse d'acides gras et de phospholipides (Lee et al., 2008; Sriburi et al., 2004, 2007). La réticulophagie, outre son rôle dans la dégradation des protéines du RE, est importante dans le maintien de l'homéostasie de ce compartiment car elle permet de réajuster sa taille, une fois le stress du RE résolu (Bernales et al., 2006).

3.3.5. Influence sur le devenir de la cellule : survie ou apoptose

L'UPR n'est pas une activation linéaire et homogène des trois voies de signalisation *via* IRE1, PERK et ATF6. Au contraire, il s'agit d'une réponse modulable, au cours de laquelle la cinétique, l'amplitude et la durée de chacune des voies de l'UPR forment un ensemble de paramètres qui conditionne le devenir de la cellule : adaptation et survie *versus* apoptose.

D'un point de vue fonctionnel, le déroulement de l'UPR pourrait être divisé en 4 phases (Woehlbier and Hetz, 2011) (**Fig 16**). Les deux premières phases sont des phases d'adaptation. Pendant la première phase, l'inhibition générale de la traduction et l'activité RIDD d'IRE1 permettent de limiter la charge protéique entrant dans le RE (phase 1). Cela permet d'alléger rapidement le stress du RE en attendant que le programme d'expression des gènes se mette en place (phase 2). Lors d'un stress chronique du RE, la voie IRE1 est atténuée (Lin et al., 2007; Rutkowski et al., 2006). L'atténuation du signal émanant d'IRE1 est le résultat de la régulation exercée par les partenaires qui se lient à la partie cytoplasmique du senseur et qui forment un interactome complexe nommé « UPRosome » (Hetz and Glimcher, 2009). Au contraire, la voie PERK est maintenue. Le facteur pro-apoptotique CHOP est instable et son accumulation dépend de la persistance du signal émanant de PERK (Rutkowski et al., 2006). Ainsi, la phase de transition (phase 3) correspond à la phase d'accumulation de CHOP. Celui-ci est un facteur de transcription qui régule positivement l'expression de certaines protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme BIM, PUMA, NOXA (Oyadomari and Mori, 2004), dont l'accumulation correspond à la phase apoptotique de l'UPR (phase 4).

Il est à noter que CHOP n'est pas la seule composante pro-apoptotique de l'UPR et que la phase de transition est bien plus complexe, intégrant d'autres signaux activés au cours de l'UPR comme l'activation de la Caspase-12 (par IRE1), la signalisation via les MAPK dont JNK, NFkB, etc (*cf* §3.2 p51). La décision de la cellule entre adaptation et apoptose dépend du « rapport de force » entre les facteurs pro-survie et pro-apoptotiques. Les paramètres qui régulent cette balance ne sont toujours pas compris.

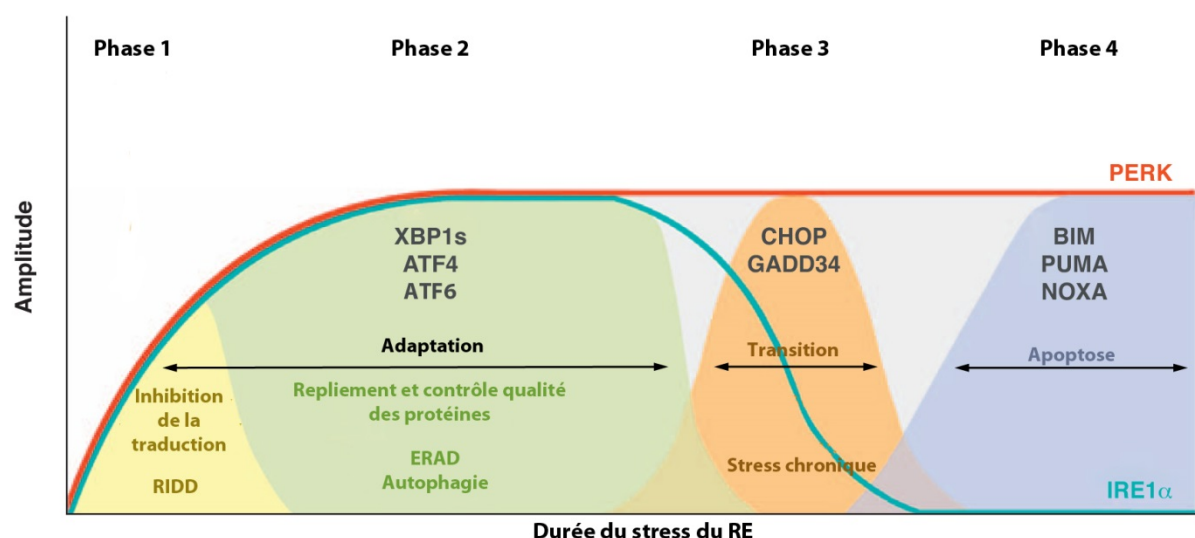


Figure 16. Différentes phases de l'UPR : adaptation–transition–apoptose (selon Woehlbier and Hetz, 2011)

3.4. Modulation de l'UPR par les virus

La synthèse des protéines virales et l'assemblage des virions dans le RE perturbent généralement l'homéostasie de ce compartiment et sont à l'origine du stress du RE. Certains aspects de l'UPR peuvent être bénéfiques à la morphogénèse virale, tandis que d'autres sont néfastes. Il n'est donc pas surprenant que les virus aient développé un panel de moyens pour moduler de manière différentielle les trois voies de l'UPR, tant au niveau des senseurs qu'au niveau de leurs effecteurs (He, 2006).

De nombreux virus inhibent la voie PERK afin d'éviter l'inhibition générale de la traduction ainsi que l'apoptose induite par CHOP. Par exemple, la protéine E2 du virus de l'hépatite C humain (HCV) se lie à PERK et l'inhibe (Pavio et al., 2003). La protéine $\gamma_{134.5}$ du virus herpès simplex 1 (Cheng et al., 2005) et la protéine DP71L du virus de la peste porcine africaine (Zsak et al., 1996) sont des homologues viraux de GADD34 et déphosphorylent activement eIF2 α . Le virus de la Dengue (Pena and Harris, 2011) et le virus du Nil occidental inhibent la voie PERK tout en orientant l'UPR vers les voies ATF6 et XBP1

pour bénéficier de la production de protéines chaperonnes et de l'augmentation de la surface membranaire du RE qui sert de support à la réplication de leur génome (Ambrose and Mackenzie, 2010). Au contraire, le cytomégalo virus humain (Isler et al., 2005) et murin (Qian et al., 2012) activent spécifiquement la voie PERK, induisant l'expression d'ATF4 qui est nécessaire à la réplication de leur génome et l'expression de leur gènes tardifs.

Les effecteurs de la voie IRE1 sont aussi la cible de plusieurs virus afin d'éviter la dégradation des composants viraux par la voie ERAD. Par exemple, HCV bloque la traduction de l'ARNm *XBPI* épissé en facteur de transcription actif (Tardif, 2004). Au contraire, certains acteurs de la voie ERAD sont indispensables à la morphogénèse des virus non enveloppés de la famille des *Polyomaviridae*, comme le virus simien 40 (SV40) (Bennett et al., 2013; Geiger et al., 2011). En effet, ces virus atteignent le RE par endocytose, puis doivent en ressortir sous forme de particule intacte pour débiter leur réplication dans le cytoplasme (Inoue and Tsai, 2011). Etant donné la taille d'une particule virale, il est très peu probable que leur sortie du RE emprunte le complexe de rétro-translocation. Cet exemple est particulièrement intéressant car il suggère l'existence des mécanismes de sortie du RE indépendants de la rétro-translocation mais dépendants des acteurs de la voie ERAD (Ploegh, 2007).

Certains virus modulent l'apoptose via la modulation de l'UPR. Tandis que l'inhibition de l'apoptose aux stades précoces de la morphogénèse virale assure la réplication du génome viral et l'assemblage des virions, l'induction de l'apoptose aux stades tardifs peut constituer un moyen de sortie des virus de la cellule hôte et est associée à leur pathogénicité. Ainsi les virus de l'encéphalite japonaise (Su et al., 2002) et de la diarrhée virale bovine induisent l'apoptose via l'UPR (Maeda et al., 2009).

3.5. Modulation de l'UPR par les drogues chimiques

Le dysfonctionnement du RE est un facteur important dans la progression de nombreuses pathologies comme le diabète, les maladies neurodégénératives et les cancers. Etant donné que la survie ou la mort cellulaire est déterminée par une modulation fine de l'UPR, une des stratégies adoptées par les recherches pharmacologiques est le *screening* de molécules qui modulent spécifiquement les différents niveaux de l'UPR et au final promeuvent le rôle pro-survie ou pro-apoptotique de l'UPR (Hetz et al., 2013). Une des stratégies de mon travail de thèse consiste à tirer bénéfice de ce large choix de composés

chimiques pour étudier la contribution de chacune des voies de l'UPR à la morphogénèse du rotavirus.

Modulateurs de la voie IRE1

Le 4μ8c (Cross et al., 2012) et la toyocamicine (Ri et al., 2012) inhibent spécifiquement l'activité endonucléase de IRE1, bloquant l'épissage de l'ARNm *XBPI* et l'activité RIDD. Le 4μ8c fait partie d'un groupe de molécules qui ciblent le résidu lysine 907 dans le site catalytique du domaine endonucléase d'IRE1 (**Fig 17A**).

Modulateurs de la voie PERK

Le GSK2606414 (ou Composé 38) se fixe au site catalytique du domaine kinase de PERK et inhibe l'activité de ce dernier (Axten et al., 2012) (**Fig 17B**).

Au contraire, le Salubrinal et le Guanabenz renforcent les effets de la voie PERK en maintenant eIF2α dans l'état phosphorylé. Le Salubrinal inhibe l'activité des deux complexes qui déphosphorylent eIF2α, le complexe GADD34-PP1C induit par l'UPR et le complexe CReP-PP1C constitutif (Boyce et al., 2005). Le Guanabenz se lie spécifiquement à GADD34 et non à CReP, empêchant GADD34 de former un complexe avec la PP1C (Tsaytler et al., 2011).

Modulateurs de la voie ATF6

Le 16F6 est un inhibiteur de PDI, qui, de manière indirecte, inhibe efficacement l'activation d'ATF6 (Higa et al., 2014). En effet, PDI est requise pour la réduction des ponts disulfures dans le domaine luminal d'ATF6, ce qui permet le transport de ce dernier vers l'appareil de Golgi (Nadanaka et al., 2007; Higa et al., 2014).

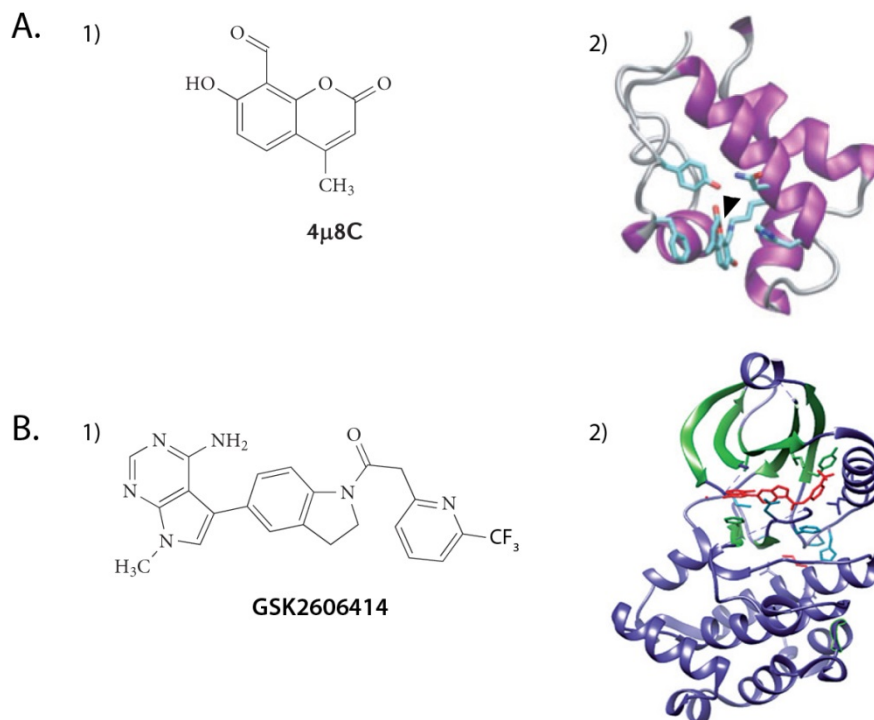


Figure 17. Inhibiteurs pharmacologiques spécifiques d'IRE1 ou de PERK (Hetz et al., 2013; Axten et al., 2012)

A. 1. Structure du composé 4μ8c, inhibiteur de l'activité endonucléase d'IRE1. **2.** Modèle de liaison covalente du composé 4μ8c au résidu K907 du site catalytique du domaine endonucléase d'IRE1 *via* une liaison imine (désignée par la pointe de flèche).

B. 1. Structure du composé GSK2606414 (ou Composé 38), inhibiteur de l'activité kinase de PERK. **2.** Structure cristallographique du composé GSK2606414 (*en rouge*) fixé au site catalytique du domaine kinase de PERK.

L'UPR est la réponse cellulaire spécifique au stress du RE consécutif à une accumulation de protéines mal/non repliées dans ce compartiment. L'UPR regroupe trois voies de signalisation, initiées par trois protéines transmembranaires du RE qui jouent le rôle de senseur de stress : IRE1, PERK et ATF6. L'action coordonnée de ces trois voies tend à résoudre le stress du RE en allégeant la charge protéique dans ce compartiment et en renforçant les fonctions du RE dans le repliement, le contrôle qualité et la dégradation des protéines. L'augmentation de l'expression des chaperonnes et enzymes de repliements par l'UPR est généralement bénéfique pour les virus qui s'assemblent dans le RE. Quant à l'induction des voies de dégradation des protéines du RE, elle serait bénéfique pour certains virus dans le sens où elles représentent des voies de sortie du RE pour les virions. Les composés chimiques qui modulent spécifiquement chacune des trois voies de l'UPR constituent un outil efficace pour étudier la contribution de chacune de ces voies dans la morphogénèse des virus.

Chapitre IV : Autophagie

L'autophagie (du grec « se manger soi-même ») est un processus catabolique qui conduit à la dégradation de constituants cytoplasmiques dans les lysosomes (ou vacuole chez la levure et les plantes). L'autophagie a aussi une fonction de recyclage, car les métabolites issus de la dégradation lysosomiale sont recyclés vers le cytoplasme, où ils sont réutilisés dans le métabolisme cellulaire. Un niveau basal d'autophagie est nécessaire au maintien du *turn-over* des protéines et organites cellulaires. Diverses conditions de stress activent des voies de signalisation menant à l'activation de l'autophagie qui, généralement, contribue à rétablir l'homéostasie cellulaire. Malgré l'identification des acteurs impliqués dans l'autophagie, l'aspect mécanistique de ce processus reste incomplètement caractérisé.

L'autophagie fait partie de la réponse immunitaire antivirale. Cependant, par la mobilisation des membranes intracellulaires qu'elle induit, elle participe également à la morphogénèse de certains virus. Les stratégies des virus pour inhiber l'autophagie ou détourner ce processus à leur profit ne cessent d'être découvertes.

4.1. Différents types d'autophagie

4.1.1. Autophagie médiée par les chaperonnes, microautophagie et macroautophagie

Il existe plusieurs types d'autophagie qui diffèrent par la façon dont les constituants cytosoliques sont délivrés dans les lysosomes (**Fig 18**).

- La macroautophagie se traduit par la séquestration des constituants cytoplasmiques dans des vésicules à double membrane, les autophagosomes, qui vont fusionner avec les lysosomes (Klionsky and Codogno, 2013). Ce type d'autophagie permet de dégrader un large ensemble de « substrats » incluant des agrégats protéiques, des organites entiers ou des pathogènes intracellulaires.
- L'autophagie médiée par les chaperonnes consiste en la translocation de protéines cytosoliques dans les lysosomes, avec l'assistance de la chaperonne cytosolique Hsc70, *via* un canal formé dans la membrane lysosomale par l'oligomérisation de la protéine transmembranaire LAMP-2A (Dice, 2007).
- La microautophagie consiste en la délivrance de « substrats » dans les lysosomes directement par invagination de la membrane de ce compartiment (Mijaljica et al., 2011).

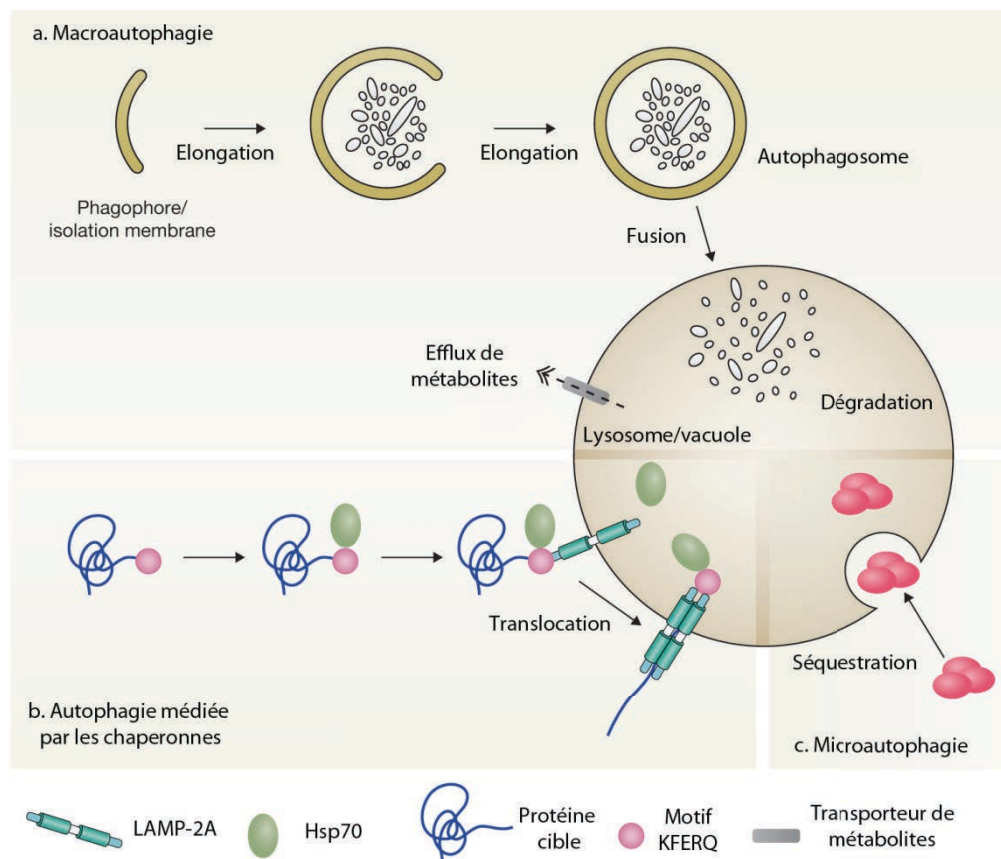


Figure 18. Différents types d'autophagie (Boya et al., 2013)

Mon travail de thèse s'est intéressé exclusivement à la macroautophagie, qui est, comme précisé dès le début de ce manuscrit, désignée par autophagie pour des raisons de simplicité.

4.1.2. Autophagie non sélective *versus* autophagie sélective

L'autophagie a longtemps été considérée comme un processus non sélectif, séquestrant de manière aléatoire des portions du cytoplasme dans les autophagosomes (on parle de *bulk autophagy*, ou autophagie non sélective). Cependant, de nombreuses évidences ont démontré que l'autophagie peut aussi être sélective, permettant l'englobement d'un cargo spécifique dans des autophagosomes qui contiennent peu de cytoplasme (Johansen and Lamark, 2011). Différents types d'autophagie sélective sont d'ailleurs distingués selon le cargo ciblé : les agrégats protéiques (l'agréphagie), les mitochondries (la mitophagie), les peroxisomes (la pexophagie), les pathogènes intracellulaires (la xénophagie), les ribosomes (la ribophagie), des portions du RE (la réticulophagie), les gouttelettes lipidiques (la lipophagie), etc.

Le caractère sélectif de l'autophagie repose sur des protéines adaptatrices qui interagissent d'une part avec un déterminant spécifique sur un cargo et d'autre part avec une protéine présente à la membrane de l'autophagosome (Johansen and Lamark, 2011). Ces adaptateurs constituent le lien physique entre le cargo et la membrane autophagique qui se forme autour de celui-ci. Les déterminants qui permettent la sélection des cargos ne sont pas clairement identifiés pour toutes les formes d'autophagie sélective. La ribophagie et la réticulophagie sont notamment les formes d'autophagie sélective les moins bien caractérisées (Cebollero et al., 2012).

L'ubiquitine est l'une des « étiquettes » qui permet la séquestration d'agrégats protéiques, d'organites et de pathogènes dans les autophagosomes (Johansen and Lamark, 2011). Ces cargos ubiquitinylés sont reconnus par des adaptateurs tels que la protéine p62, aussi appelée séquestosome 1 (SQSTM1), et la protéine *Neighbor of BRCA1 gene* (NBR1) (**Fig 19**). D'une part, elles possèdent un domaine de liaison à l'ubiquitine (UBA) qui permet leur interaction avec les résidus mono-ubiquitine ou les chaînes poly-ubiquitine présents sur les cargos. D'autre part, le motif *LC3-interacting region* (LIR) leur permet d'interagir avec la protéine LC3 présente sur la membrane autophagique.

Actuellement, même si le schéma global de la machinerie de formation des autophagosomes est relativement bien caractérisé, il n'a pas été établi que des différences puissent exister entre les mécanismes de formation des autophagosomes dans l'autophagie non sélective et dans l'autophagie sélective.

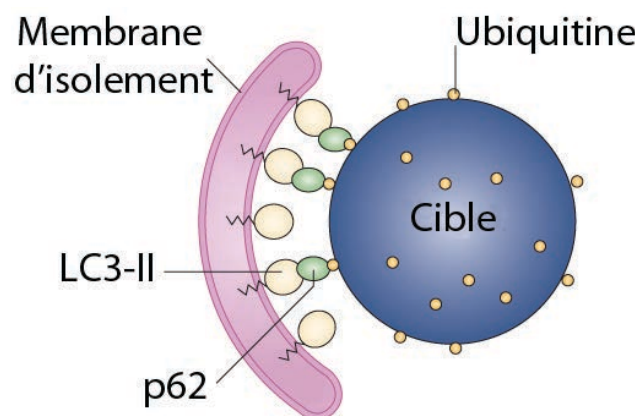


Figure 19. Autophagie sélective dépendant de p62 (ou de NBR1) (Lamb et al., 2013)

4.2. Machinerie autophagique

La formation des autophagosomes débute par la formation d'une structure membranaire en forme de croissant, appelée phagophore ou membrane d'isolement. Le phagophore s'allonge et se referme sur lui-même, donnant naissance à l'autophagosome (**Fig 20A**). La caractérisation des mécanismes moléculaires de l'autophagie a débuté il y a moins d'une quinzaine d'années avec l'identification des protéines *AuTophagy-related* (ATG) par *screening* génétique chez la levure. A ce jour on compte plus de 30 protéines ATG chez la levure, dont la majorité est conservées chez les mammifères.

Dans les paragraphes suivants, je décrirai successivement les étapes qui conduisent à la formation de l'autophagosome chez les mammifères : nucléation du phagophore, élongation du phagophore, apports membranaires pour la formation de l'autophagosome et étapes tardives de l'autophagie. Je terminerai en abordant les mécanismes alternatifs de formation des autophagosomes.

4.2.1. Nucléation du phagophore

L'autophagie est régie par un *master regulator* qui est le complexe *Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1* (mTORC1) contenant la sérine/thréonine kinase mTOR (Díaz-Troya et al., 2008). L'inactivation de mTORC1 (par divers stimuli qui seront présentés ultérieurement dans la partie 4.3 p74) permet l'activation et le recrutement de différents acteurs vers le site de nucléation du phagophore (**Fig 20B**). Il s'agit de multiples sites spécifiques localisés à la membrane du RE, enrichis en Phosphatidyl-Inositol-3-phosphate (PI3P), appelés omégasomes (Axe et al., 2008; Hayashi-Nishino et al., 2009).

Deux acteurs sont recrutés très précocement au niveau de l'omégasome : le complexe contenant la kinase *Unc-51-like kinase 1/2* (ULK1/2) et le complexe contenant la kinase hVps34, qui est une Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) de classe III (**Fig 20B**).

- La kinase ULK1/2 est associée aux protéines partenaires ATG13, *Focal adhesion kinase family Interacting Protein of 200 kDa* (FIP200) et ATG101, dans un complexe désigné par complexe ULK1/2 (Jung et al., 2009). Celui-ci est normalement maintenu inactif grâce à la phosphorylation de ULK1/2 et de ATG13 par mTOR (Jung et al., 2009; Hosokawa et al., 2009b). Quand mTOR est inhibé, la non-phosphorylation de ULK1/2 sur les sites ciblés par mTORC1 permet son activation (Mizushima, 2010). Les mécanismes de recrutement du complexe ULK1/2 vers l'omégasome ne sont pas bien établis.

- Il existe plusieurs complexes contenant la PI3K de classe III hVps34, dont un seul est impliqué dans la formation des autophagosomes (Vanhaesebroeck et al., 2010). Le complexe en question, désigné par complexe PI3K, contient la PI3K hVps34 associée aux protéines partenaires hVps15 (ou p150), Beclin-1 et ATG14L. ATG14L est nécessaire au recrutement du complexe PI3K vers l'omégasome (Matsunaga et al., 2010), entre autres en interagissant avec la protéine ATG13 du complexe ULK1/2 (Itakura and Mizushima, 2010; Jao et al., 2013). Au niveau de l'omégasome, le complexe PI3K produit des PI3P qui sont indispensables à la formation de l'autophagosome car ils servent de sites d'amarrage pour le recrutement d'autres acteurs de la machinerie autophagique. Malgré de nombreuses études qui positionnent le complexe ULK1/2 en amont du complexe PI3K dans la nucléation de l'autophagosome, l'interdépendance de ces deux complexes n'est pas totalement claire (Karanasios et al., 2013).

Les effecteurs recrutés à l'omégasome par la liaison au PI3P sont la protéine *Double FYVE-Containing Protein 1* (DFCP1) (Axe et al., 2008) et la famille des protéines *WD-repeat protein Interacting with PhosphoInositides* (WIPI 1-4) (Proikas-Cezanne et al., 2004) (**Fig 20B**). Ils seraient nécessaires pour la progression du phagophore en autophagosome. Par exemple, WIPI-2 est nécessaire à la lipidation de la protéine LC3 (Polson et al., 2010) (*cf* § 4.2.2 p68). Cependant, les mécanismes d'intervention de DFCP1 et des protéines WIPI sont encore mal connus.

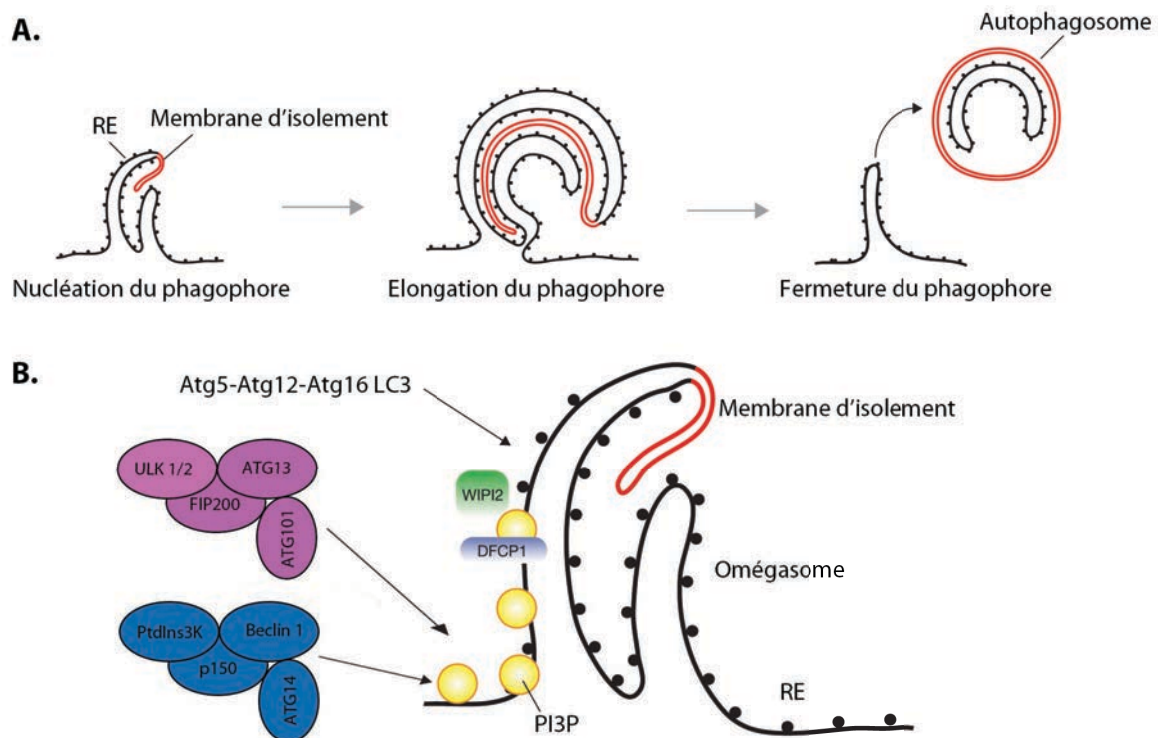


Figure 20. Modèle de formation de l'autophagosome à partir de la membrane du RE (selon Tooze and Yoshimori, 2010)

A. Des sites spécifiques de la membrane du RE appelés omégasome supportent la nucléation du phagophore, ou membrane d'isolement (*en rouge*), cette dernière se retrouvant en « sandwich » entre deux « citernes » du RE. Le phagophore s'allonge et se ferme sur lui-même pour former l'autophagosome, qui se détache de l'omégasome.

B. Le complexe contenant la kinase ULK1/2 (*en violet*) et celui contenant la PI3K de classe III (*en bleu*) sont recrutés précocement au niveau de l'omégasome. Les PI3P générés par la PI3K servent à recruter les effecteurs WIPI et DFCP1, ainsi que les deux systèmes de conjugaison *ubiquitin-like* qui vont lipider LC3 (non représentés).

4.2.2. Elongation du phagophore en autophagosome : deux systèmes de conjugaison *ubiquitin-like*

L'élongation et la fermeture du phagophore en autophagosome repose sur l'ancrage spécifique des protéines de la famille des ATG8 à la membrane du phagophore (Weidberg et al., 2010). Cette famille de protéines regroupe plusieurs membres identifiés comme homologues d'Atg8 chez la levure, et divisés en 2 sous-familles :

- la sous-famille des protéines LC3, impliquée dans l'étape d'élongation du phagophore. Des trois membres LC3-A, -B et -C, seul le rôle de LC3-B dans l'autophagie a été bien établi. Par la suite, LC3-B sera désignée simplement par LC3 sauf précision contraire. De par sa présence spécifique sur le phagophore, l'autophagosome et l'autolysosome, LC3 est utilisée comme un marqueur de référence de ces structures autophagiques, tant en biochimie qu'en imagerie.

- la sous-famille des protéines *GABA Receptor-Associated Protein* (GABARAP) / *Golgi-associated ATPase Enhancer of 16kDa* (GATE-16), qui intervient plus tardivement, dans l'étape de fermeture du phagophore en autophagosome.

Les protéines ATG8, normalement cytosoliques, s'ancrent à la membrane du phagophore en croissance grâce à leur conjugaison à la phosphatidyl-éthanolamine (PE) (Kabeya et al., 2004). Cette conjugaison spécifique, ou lipidation, requiert deux systèmes de conjugaison qui ressemblent à la conjugaison de l'ubiquitine aux protéines substrats, d'où le nom de systèmes de conjugaison *ubiquitin-like* (**Fig 21**).

- Le premier système consiste en la conjugaison de LC3 (ou de GABARAP/GATE-16), considérée comme équivalent à l'ubiquitine, à son substrat, la PE. Normalement LC3 est soluble dans le cytoplasme sous la forme de pro-LC3. La pro-LC3 est clivée par ATG4, donnant la forme LC3-I qui expose un résidu glycine en C-terminale (Tanida et al., 2004). LC3-I est alors activée par ATG7 (équivalente à l'enzyme E1 dans la conjugaison de l'ubiquitine), puis transférée sur ATG3 (équivalente à l'enzyme E2) (Geng and Klionsky, 2008). Enfin, le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1, considéré comme équivalent à l'enzyme E3, conjugue LC3-I à la PE (Hanada et al., 2007; Fujita et al., 2008). La forme de LC3 conjuguée à la PE est dite forme LC3-II et se retrouve sur les membranes interne et externe de l'autophagosome (Kabeya, 2000; Kabeya et al., 2004; Kirisako et al., 1999). La lipidation de LC3 est réversible car ATG4 peut aussi délipider LC3 *in vitro* (Kabeya et al., 2004).
- Le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 est lui-même formé selon un système de conjugaison *ubiquitin-like*, dans lequel ATG12 est l'équivalent de l'ubiquitine. ATG12 est activée par ATG7 (enzyme E1), puis transférée sur ATG10 (enzyme E2), et enfin conjuguée à son substrat ATG5 (Geng and Klionsky, 2008). Aucune protéine équivalente à l'enzyme E3 n'a été identifiée dans cette dernière étape de conjugaison. La liaison entre ATG12 et ATG5 est covalente et irréversible, tandis qu'ATG5 interagit de manière non covalente avec ATG16L1 (Mizushima et al., 2003; Fujioka et al., 2010). Le domaine coiled-coil d'ATG16L1 permet sa dimérisation puis la formation d'un complexe multimérique composé d'un dimère d'ATG16L1 associé chacun à un complexe ATG5-ATG12. Des études de microscopie électronique ont montré que le complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 est majoritairement présent à la face externe du phagophore et s'en détache lorsque l'autophagosome est complètement formé (Mizushima et al., 2001).

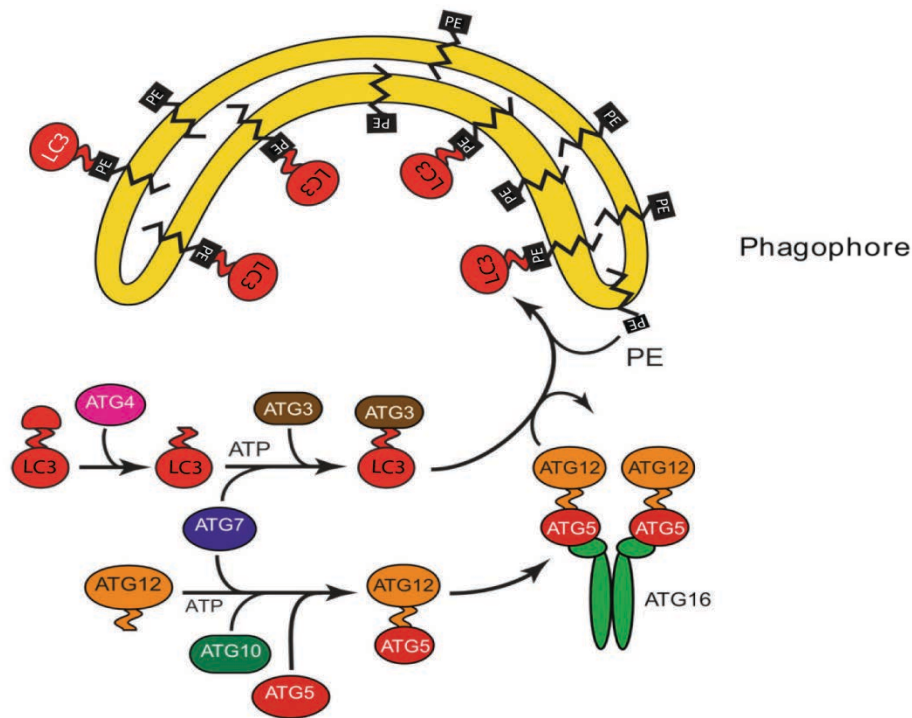


Figure 21. Deux systèmes de conjugaison *ubiquitin-like* impliqués dans la formation de l'autophagosome (adapté de Li and Vierstra, 2012)

Les mécanismes qui assurent la restriction spatiale de LC3 sur les membranes autophagiques ne sont pas complètement compris. Il a été montré que le site membranaire où se trouve la forme lipidée de LC3 (LC3-II) est dicté par la localisation du complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 (Fujita et al., 2008). Le recrutement de ce complexe vers le site de formation des autophagosomes reposerait sur l'interaction directe d'ATG16L1 avec FIP200 du complexe ULK1/2 (Gammoh et al., 2012; Nishimura et al., 2013). Ensuite, LC3 est recrutée, sous forme conjuguée à ATG3, vers le complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 *via* l'interaction directe d'ATG3 avec ATG12 (Noda et al., 2012) (**Fig 22**). ATG3 possède une hélice amphipathique en N-terminal qui détecte le niveau de courbure membranaire et restreint la lipidation de LC3 aux membranes fortement courbée telles que les extrémités du phagophore en croissance (Nath et al., 2014).

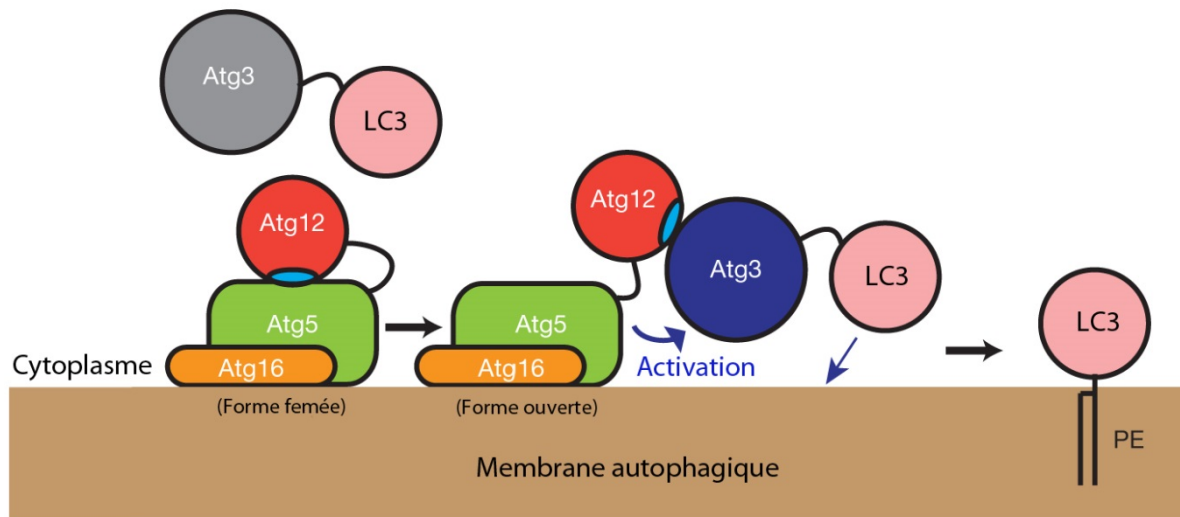


Figure 22. Modèle d'action du complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 dans la lipidation de LC3 au niveau de la membrane du phagophore (adapté de Noda et al., 2012)

Le complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 est recruté à la membrane du phagophore grâce à ATG16L1. D'une conformation initialement fermée, il acquiert une conformation ouverte en présence de LC3 conjuguée à ATG3. Dans la conformation ouverte, ATG12 interagit directement avec ATG3 et favorise la conjugaison de LC3 à la PE présente à la membrane du phagophore.

Bien que la lipidation de LC3 soit indispensable à la formation des autophagosomes, on ne sait pas exactement comment l'ancrage de LC3 à la membrane du phagophore permet son expansion. Une étude a montré que, *in vitro*, la forme LC3-PE est capable de provoquer l'agrégation des liposomes et faciliter leur hémifusion (Nakatogawa et al., 2007). D'ailleurs, la quantité de LC3 dans la cellule n'influence pas le nombre d'autophagosomes, mais joue sur leur taille (Xie et al., 2008). Ces observations suggèrent que LC3 contrôle la phase d'élongation du phagophore probablement grâce à ses capacités à promouvoir l'attachement et la fusion de vésicules.

4.2.3. Apports membranaires pour la formation de l'autophagosome

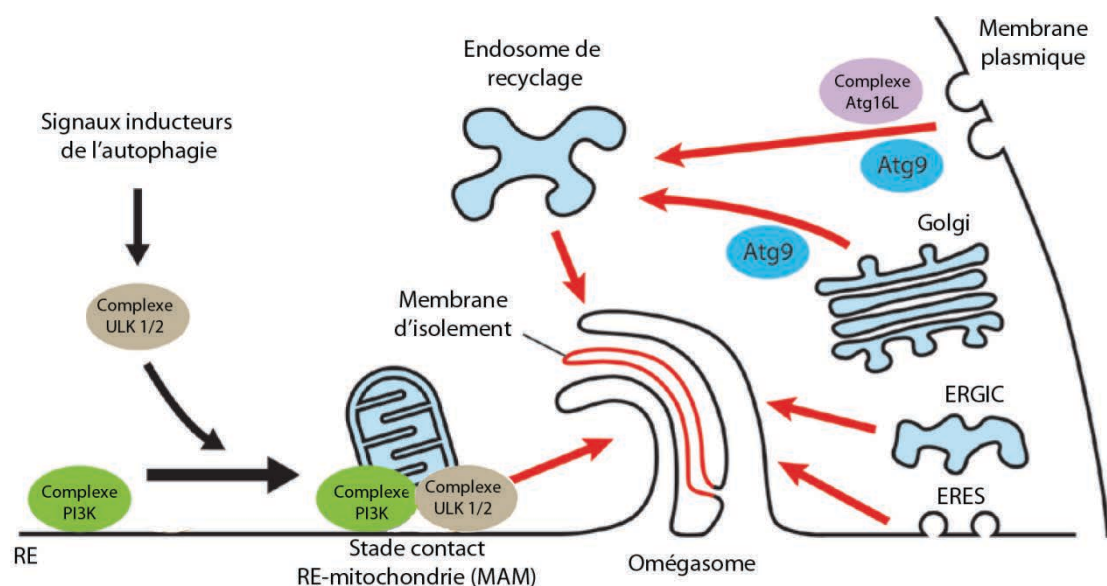


Figure 23. Apports membranaires pour l'élargissement du phagosome (adapté de Shibutani and Yoshimori, 2014)

La formation de l'autophagosome implique des événements de fusion de vésicules de différentes origines avec le phagosome (**Fig 23**), qui font intervenir de nombreuses protéines Rab (Szatmári and Sass, 2014) et des protéines *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor* (SNARE) (Moreau et al., 2013). Plusieurs compartiments intracellulaires autres que le RE ont été identifiés comme fournisseurs de membranes à l'autophagosome :

- Les mitochondries : La membrane externe des mitochondries a été identifiée comme lieu de nucléation de l'autophagosome (Hailey et al., 2010). Par la suite, l'étude de Hamasaki et collègues a permis de réconcilier les origines mitochondriales et réticulaires du phagosome en démontrant que la formation de celui-ci a lieu au niveau des sites de contact entre le RE et les mitochondries, les sites *Mitochondria-Associated Membranes* (MAM) (Hamasaki et al., 2013). Etant donné que la membrane mitochondriale est riche en PE, il est supposé que ce lipide indispensable à la formation des autophagosomes est transféré des mitochondries vers le RE *via* les MAM.
- Le compartiment intermédiaire ERGIC : ce compartiment a été récemment identifié par Ge et collègues comme étant aussi un site potentiel de nucléation de l'autophagosome (Ge et al., 2013).

- L'appareil de Golgi et les endosomes : ATG9 est la seule protéine transmembranaire parmi les ATG. ATG9 est localisé dans la région juxtanucléaire correspondant au TGN, et aussi au niveau des endosomes en région périphérique (Young et al., 2006; Orsi et al., 2012). Quand l'autophagie est induite, des structures tubulo-vésiculaires contenant ATG9 sont mobilisées vers les sites de formation des autophagosomes.
- La membrane plasmique : ATG16L1 et ATG9 sont endocytés à partir de la membrane plasmique et rejoignent les endosomes de recyclage, d'où vont émaner des structures tubulo-vésiculaires contenant ces deux protéines et qui constituent une source de membrane au phagophore en croissance (Puri et al., 2013).

4.2.4. Etapes tardives de l'autophagie

Les étapes tardives de l'autophagie consistent en la fusion des autophagosomes avec les compartiments lytiques et la dégradation du contenu des autophagosomes, ce qui complète le flux autophagique. Les autophagosomes peuvent fusionner avec les endosomes, donnant naissance à l'amphisome qui va ensuite s'acidifier, ou fusionner directement avec les lysosomes, devenant alors des autolysosomes. Certains acteurs de la machinerie d'arrimage et de fusion impliquée dans le trafic intracellulaire ont été identifiés comme étant impliqués dans ces étapes tardives de l'autophagie, comme les petites GTPases Rab11 et Rab7 (Szatmári and Sass, 2014), la t-SNARE Vti1b et les v-SNARE VAMP3 et VAMP7 (Moreau et al., 2013). Par ailleurs, le changement des partenaires dans le complexe Beclin-1-hVps34 régule l'autophagie à différents niveaux : tandis que le complexe contenant Beclin-1-hVps34-ATG14L régule la nucléation de l'autophagosome, celui contenant Beclin-1-hVps34-UVRAG régule la fusion de ceux-ci avec les endo/lysosomes (Liang et al., 2008).

A côté des acteurs de la machinerie d'arrimage et de fusion, la fusion des autophagosomes avec les lysosomes requiert également les protéines *Lysosomal-Associated Membranes Proteins* (LAMP) 1 et 2, présentes à la membrane des lysosomes (Eskelinen, 2005). Du côté de l'autophagosome, l'étape de fusion est facilitée par le retrait des protéines LC3 ancrées à la membrane externe de celui-ci, par le processus de délipidation, médié par ATG4 (Yu et al., 2012).

4.2.5. Mécanismes alternatifs de formation des autophagosomes

Récemment, différentes études ont décrit des mécanismes alternatifs, ou non canoniques, de formation des autophagosomes, qui n'impliquent pas la totalité des acteurs de la voie canonique décrite ci-dessus (Codogno et al., 2012).

En général les mécanismes non canoniques sont indépendants de l'un ou l'autre des deux complexes ULK1/2 et PI3K. L'autophagie indépendante d'ULK1/2 a été décrite dans le cas de carence en glucose (Cheong et al., 2011). L'autophagie indépendante de Beclin-1, qui a lieu par exemple dans les cellules cancéreuses exposées au Resveratrol (Scarlati et al., 2008), est le mécanisme non canonique le plus communément décrit (Codogno et al., 2012). Dans ces cas-là, l'acteur responsable de la production de PI3P n'est pas connu (Mauthe et al., 2011).

Une caractéristique qui semble être commune à certaines formes d'autophagie non canonique serait la dépendance à l'apport membranaire provenant des endosomes et de l'appareil de Golgi. Par exemple, une étude récente a mentionné une forme d'autophagie non canonique qui ne dépend ni du complexe ULK1/2, ni du complexe PI3K, mais qui dépend d'ATG9 (Chen et al., 2013). Une autre étude a décrit une forme d'autophagie indépendante de la lipodation de LC3 mais qui implique la petite GTPase Rab 9, qui assure le trafic entre les endosomes tardifs et l'appareil de Golgi (Nishida et al., 2009).

4.3. Voies de signalisation régulant l'autophagie

L'autophagie existe dans la cellule à un niveau basal qui assure le *turn-over* des protéines et organites cellulaires. Elle peut être induite en cas de carence en nutriments, de déplétion en énergie ou lors de divers stress cellulaires. L'induction de l'autophagie dans ces conditions permet généralement de restaurer l'homéostasie cellulaire et d'éviter l'apoptose (Kroemer et al., 2010).

Les voies de signalisation qui régulent l'autophagie sont complexes. Elles s'articulent principalement autour du complexe mTORC1. Les grandes voies de signalisation régulant l'autophagie sont présentées dans la **Figure 24**. Les voies de signalisation qui relient le stress du RE à l'autophagie sont présentées dans la **Figure 25**.

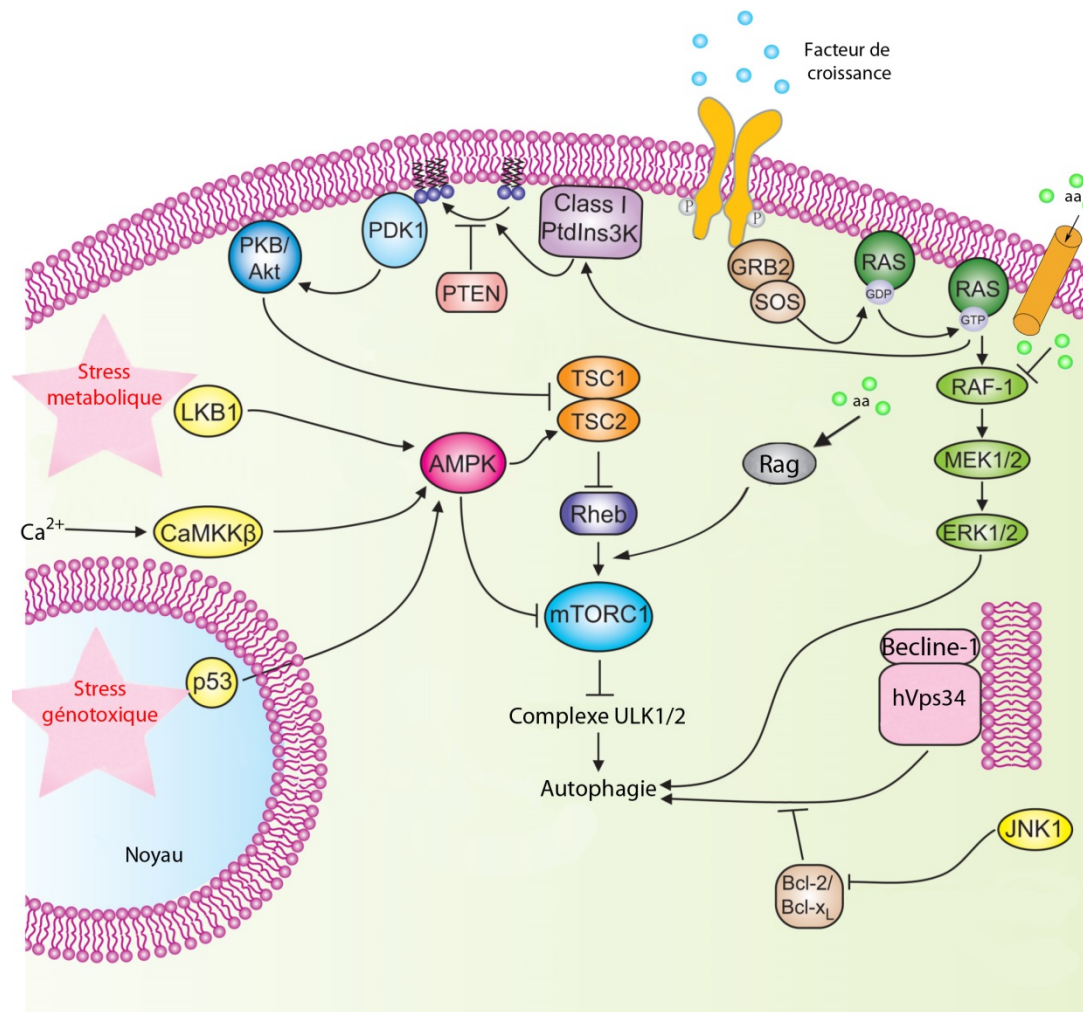


Figure 24. Voies de signalisation régulant l'autophagie (adapté de Yang and Klionsky, 2010)

4.3.1. Activation de mTORC1 par les facteurs de croissance et les acides aminés

L'activation de mTORC1 repose sur l'intégration d'un ensemble de signaux qui reflète les statuts nutritionnel (présence de facteurs de croissance et d'acides aminés) et énergétique (ratio AMP/ATP) de la cellule. La sensibilité de mTORC1 au statut énergétique de la cellule sera discutée séparément car elle passe par la voie *AMP-activated protein kinase* (AMPK) qui intègre elle-même d'autres signaux que le ratio AMP/ATP.

La liaison des facteurs de croissance à leurs récepteurs membranaires stimule la voie Ras – PI3K de classe I – Akt/PKB (Yang and Klionsky, 2010). Une fois activée, la kinase Akt/PKB phosphoryle et inhibe l'activité du complexe *Tuberous Sclerosis Complex 1/2* (TSC1/2) qui présente une activité GAP favorisant l'hydrolyse du GTP sur la petite GTPase Rheb. Or, Rheb-GTP est nécessaire à l'activation de mTORC1. Ainsi, l'inactivation du

complexe TSC1/2 par Akt/PKB permet à Rheb d'activer mTORC1 et de réprimer l'autophagie.

mTORC1 est également activé par la présence d'acides aminés. L'activation de la MAPK ERK *via* la cascade Raf-MEK-ERK peut activer l'autophagie, or Raf est inhibée en présence d'acides aminés (Yang and Klionsky, 2010). Par ailleurs, la présence d'acides aminés active mTORC1 *via* la petite GTPase Rag (Kim et al., 2008).

4.3.2. Inhibition de mTORC1 par AMPK

L'AMPK est un senseur du niveau énergétique de la cellule. AMPK est activée de manière allostérique par la liaison de l'AMP, tandis qu'elle est inhibée par l'ATP (Hardie, 2004). Lors d'une déplétion énergétique, le ratio AMP/ATP élevé contribue à activer AMPK. L'activation optimale d'AMPK requiert l'activité de la *Liver kinase B1* (LKB1), une AMPK kinase qui phosphoryle AMPK au niveau de la boucle d'activation (Hawley et al., 1996). Cette phosphorylation activatrice est d'ailleurs dépendante de la liaison de l'AMP à AMPK.

La voie LKB1–AMPK permet l'inhibition de mTORC1 et l'induction de l'autophagie en réponse à la déplétion énergétique. AMPK inhibe mTORC1 de manière indirecte, en activant le complexe TSC1/2 répresseur de mTORC1 (Corradetti et al., 2004), et de manière directe en phosphorylant la sous-unité Raptor du complexe mTORC1 (Gwinn et al., 2008).

D'autres conditions de stress activent l'autophagie *via* l'activation d'AMPK. Par exemple, la concentration élevée en Ca^{2+} dans le cytoplasme active la *Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase- β* (CaMKK β), qui phosphoryle et active AMPK (Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007). La protéine suppresseur de tumeur p53 active aussi AMPK selon un mécanisme inconnu (Feng et al., 2005).

Il est intéressant de noter que LKB1, la kinase qui active AMPK, est un *master regulator* de la polarisation cellulaire. Dans les cellules intestinales humaines Caco-2, il a été montré que l'activation de LKB1 suffit à induire la polarisation d'une cellule isolée (Baas et al., 2004). Il semble donc raisonnable de penser que la polarisation et la différenciation cellulaire soient en relation avec le niveau basal de l'autophagie. Nous y reviendrons dans la mesure où les cellules intestinales Caco-2 polarisées et différenciées sont le modèle de référence que nous utiliserons parce qu'il se rapproche de la cible naturelle du rotavirus.

4.3.3. Régulation de l'interaction entre Beclin-1 et Bcl-2

L'interaction entre Beclin-1 et Bcl-2 constitue un autre nœud de régulation de l'autophagie. Beclin-1 est normalement « piégé » par l'interaction directe avec la protéine Bcl-2 (Pattingre et al., 2005), ce qui l'empêche de s'associer avec la PI3K hVps34. Plusieurs voies de signalisation activent l'autophagie en induisant la dissociation de Beclin-1 de Bcl-2. Par exemple, la kinase JNK, activée dans de nombreuses conditions de stress, dont le stress du RE, phosphoryle Bcl-2, l'empêchant d'interagir avec Beclin-1 (Wei et al., 2008).

4.3.4. Induction de l'autophagie par le stress du RE

Le stress du RE induit généralement l'autophagie. Cette connexion repose sur la signalisation médiée par le Ca^{2+} et sur la signalisation médiée par l'UPR (Fig 25).

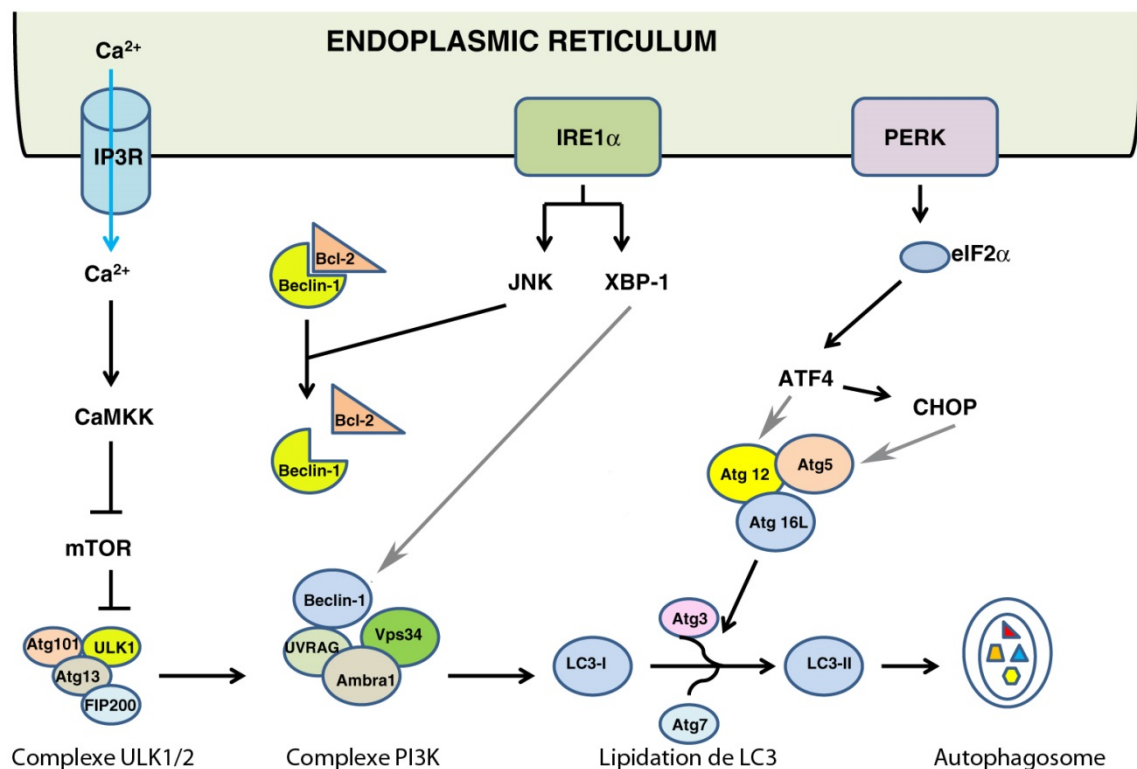


Figure 25. Induction de l'autophagie lors du stress du RE (selon Sano and Reed, 2013)

L'autophagie est connectée au stress du RE par la signalisation *via* le Ca^{2+} et la signalisation de l'UPR. Les régulations positives de l'autophagie au niveau transcriptionnel sont représentées par des flèches grises. Tous les autres mécanismes de régulation sont représentés par des flèches (activation) ou barres (inhibition) noires.

Hoyer-Hansen et collègues ont montré que le relargage du Ca^{2+} du RE vers le cytoplasme lors du stress du RE active la $\text{CaMKK}\beta$, qui active AMPK et inhibe mTORC1 (Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007). La kinase JNK, activée par IRE1, phosphoryle Bcl-2 de

sorte que cette dernière se dissocie de Beclin-1 (Ogata et al., 2006; Wei et al., 2008). Par ailleurs, les facteurs de transcription activés par l'UPR régulent positivement l'autophagie au niveau transcriptionnel : XBP1, ATF4 et CHOP promeuvent respectivement l'expression de Beclin-1, ATG12 et ATG5 (Margariti et al., 2013; Kuroku et al., 2007; Rouschop et al., 2010).

4.4. Modulation de l'autophagie par les virus

L'autophagie est impliquée dans les réponses immunitaires innée et adaptative. Elle peut être néfaste pour la réplication des virus en dégradant les particules virales ou composés viraux dans les lysosomes (xénophagie) (Levine, 2005). Par ailleurs, l'autophagie contribue à la réponse interféron (IFN) anti-virale en délivrant le matériel génétique viral aux *Toll-like receptors* (TLR) endosomaux (Jordan and Randall, 2012). L'autophagie participe aussi au chargement des peptides sur le CMH-I et le CMH-II (Jordan and Randall, 2012; English et al., 2009).

Les virus ont développés de nombreux mécanismes qui inhibent l'autophagie, ciblant toutes les étapes de ce processus. La protéine Env du virus de l'immunodéficience humaine VIH-1 inhibe l'induction de l'autophagie dans les cellules dendritiques infectées en activant mTORC1 (Blanchet et al., 2010). Certains membres de la famille des *Herpesviridae* codent pour des protéines virales qui interagissent directement avec Beclin-1 et « piègent » celle-ci de la même manière que la protéine cellulaire Bcl-2, l'empêchant de s'associer à la PI3K hVps34, ce qui bloque la nucléation des autophagosomes (Orvedahl et al., 2007; Sinha et al., 2008). L'herpes virus Gamma responsable du sarcome de Kaposi code pour une protéine homologue à la *FLICE-like inhibitor protein* qui inhibe l'élongation du phagophore en empêchant la liaison de LC3 à ATG3 (Lee et al., 2009).

Au contraire, d'autres virus exploitent les remaniements membranaires liés à l'autophagie, ou du moins en relation avec la machinerie autophagique, pour leur morphogénèse. Tous les virus à ARN simple brin à polarité positive (ARNsb (+)) induisent un remaniement considérable des membranes intracellulaires, produisant des structures à double membrane (DMV), qui servent de support physique à la réplication du génome viral. Ces DMV sont semblables morphologiquement aux autophagosomes, d'où leur appellation de membranes *autophagic-like*. Bien que l'identité des DMV en tant qu'autophagosomes reste en débat, il a été montré dans certains cas comme ceux du poliovirus (Taylor and Kirkegaard, 2007) ou du coxakiavirus B3 (Wong et al., 2008), que la machinerie autophagique est

clairement impliquée dans la formation de ces structures. Dans le cas du coronavirus, les structures membranaires ne sont pas des autophagosomes mais sont en fait dérivées des EDEMosomes et sont recouvertes de la protéine LC3 non lipidée (LC3-I) (Reggiori et al., 2010). Outre le cas des virus à ARNs (+), l'autophagie favorise les étapes d'assemblage et/ou de sortie de certains virus comme le VIH-1 (Kyei et al., 2009) ou le virus de l'hépatite B (Li et al., 2011). De manière intéressante, le poliovirus, un virus non enveloppé, induit non seulement la formation de membranes de type autophagique qui servent de support pour la réplication de son génome, mais utiliserait également les autophagosomes pour sortir de la cellule hôte de manière non lytique (Jackson et al., 2005). En général, les virus qui tirent bénéfice des membranes autophagiques bloquent le flux autophagique à l'étape tardive, c'est-à-dire la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Wong et al., 2008; Sir et al., 2008; Li et al., 2011). On parle alors de détournement du processus autophagique.

Malgré la découverte continue de nouveaux acteurs impliqués dans l'autophagie, le mécanisme global de ce processus reste à élucider. De nombreuses situations de stress cellulaires convergent vers l'induction de l'autophagie, ce qui rend complexe l'analyse des rôles physiologiques de ce processus. Il est cependant clair que les divers rôles de l'autophagie reposent d'une part sur sa fonction de dégradation, et d'autre part sur la mobilisation et le remaniement des membranes intracellulaires qu'elle induit. L'autophagie en tant que processus de dégradation est généralement inhibée par les virus. Par contre, les membranes autophagiques ou une partie de la machinerie autophagique peut promouvoir la réplication de certains virus.

Chapitre V : Rotavirus

5.1. Physiopathologie du rotavirus

5.1.1. Importance médicale du rotavirus

Les rotavirus constituent un genre appartenant à la famille des *Reoviridae* et sont nommés ainsi en raison de leur morphologie en forme de roue observée en microscopie électronique (« rota » signifie « roue » en latin). Ces virus ont initialement été isolés à partir de biopsies de muqueuses duodénales provenant d'enfants atteints de gastro-entérites non bactériennes (Bishop et al., 1973) ou d'échantillons de fèces de veaux, souriceaux ou poulains souffrant de diarrhée (Flewett et al., 1975). Il s'agit d'un virus non enveloppé, dont le génome est constitué de 11 segments d'ARN double brin (ARNdb).

Les rotavirus sont considérés comme l'agent étiologique majeur responsable de gastro-entérites aiguës (GEA) chez les jeunes enfants et jeunes animaux. Le mode de transmission est la voie oro-fécale. Chez les enfants, les principaux signes cliniques sont : diarrhée, douleurs abdominales, vomissements, fièvre modérée. La gravité est liée à la déshydratation. Dans de rares cas, une virémie atteignant le système nerveux central provoque des complications neurologiques graves (Goldwater et al., 2001). Quasiment tous les enfants âgés de 5 ans ont connu une infection à rotavirus avec un pic d'incidence de la première infection entre 12-18 mois. Les formes sévères de la maladie surviennent généralement lors de l'infection primaire, les réinfections provoquant des symptômes de moindre importance jusqu'à la forme asymptomatique chez les adultes (Ward, 1996).

Il n'existe actuellement aucun traitement curatif spécifique contre les GEA à rotavirus. La déshydratation provoquée par les diarrhées est compensée par un apport de solutions aqueuses équilibrées en électrolytes, ce qui permet une guérison en 3 à 4 jours. Ce type de soins est délivré dans des structures hospitalières qui peuvent se révéler difficiles d'accès aux populations des pays les moins industrialisés, expliquant le nombre encore important d'infections fatales dans ces régions.

Avant l'introduction du programme de vaccination anti-rotavirus à l'échelle mondiale, les GEA dues aux rotavirus causaient plus de 450.000 décès par an chez les enfants de moins de 5 ans, dont la majorité concerne les pays en développement (Tate et al., 2012) (**Fig 26**). Dans les pays industrialisés, les GEA à rotavirus évoluent généralement vers la guérison, grâce à la facilité d'accès aux soins. Cependant, elles sont à l'origine d'enjeux majeurs de santé publique dû à l'impact des coûts de consultation et d'hospitalisation pédiatriques. Chez

les animaux, l'infection à rotavirus engendre des conséquences économiques non négligeables.

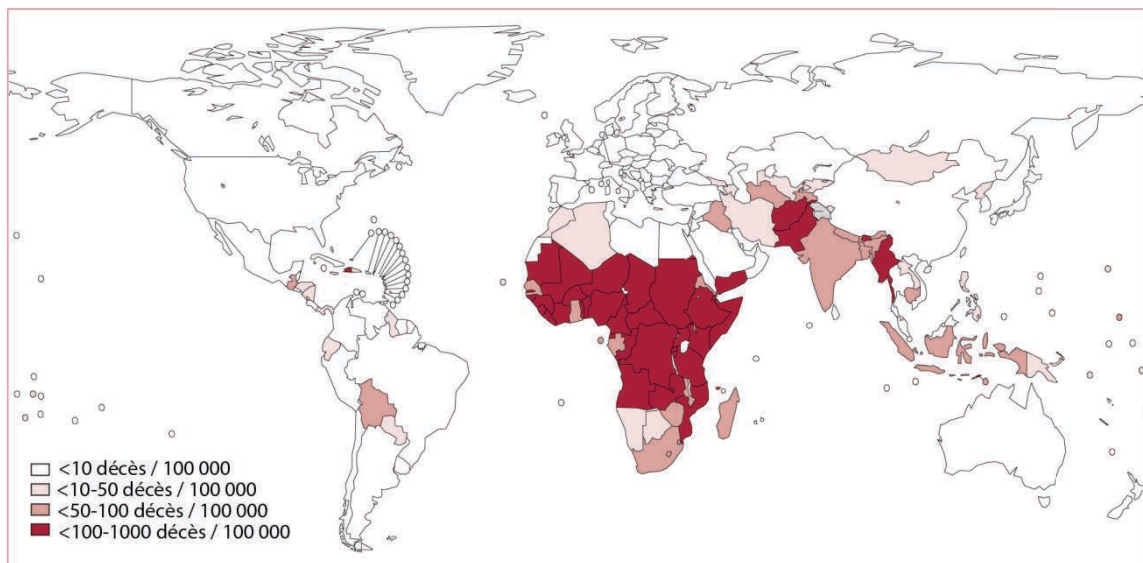


Figure 26. Répartition géographique de la mortalité infantile due à l'infection par le rotavirus avant l'introduction du programme de vaccination à l'échelle mondiale (données de 2008) (Tate et al., 2012)

Le nombre total de décès infantiles dans le monde était de 453.000. Le taux de mortalité est calculé par pays et par tranche de 100.000 enfants.

Actuellement, deux vaccins anti-rotavirus sont commercialisés dans de nombreux pays dont la France : RotaTeq® (Merk-Sanofi Pasteur MSD) et Rotarix® (Glaxo Smith Kline Biologicals). Tous les deux utilisent des souches vaccinales atténuées (Glass and Parashar, 2006). Ces vaccins ont largement démontré leur efficacité car dans les pays avec une couverture vaccinale de plus de 80%, on observe une diminution de plus 80% des cas de GEA dues au rotavirus (Patel et al., 2011). Cependant, ils possèdent certains inconvénients: d'une part, la généralisation de la vaccination dans les pays en développement est freinée par le coût des vaccins et d'autre part, la réversion de l'atténuation est possible dans les souches vaccinales, d'autant plus que les bases moléculaires de l'atténuation ne sont pas connues. Pour ces raisons, la compréhension de la biologie du rotavirus nécessite toujours une attention particulière afin d'élaborer des traitements anti-rotavirus efficaces à long terme, tant au niveau curatif qu'au niveau préventif.

5.1.2. Tropisme cellulaire et physiopathologie des diarrhées dues aux rotavirus

L'analyse de biopsies issues de jeunes animaux (Majerowicz et al., 1994; Mebus et al., 1978; Salim et al., 1995; Snodgrass et al., 1979; Torres-Medina and Underdahl, 1980) et

d'enfants infectés par le rotavirus (Bishop et al., 1973; Davidson et al., 1975) montre que l'infection cible préférentiellement l'intestin grêle, au niveau du jéjunum et de l'iléon (**Fig 27**). La surface de l'intestin grêle forme des villosités séparées par des cryptes (Ramig, 2004). Le rotavirus a un tropisme marqué pour les entérocytes qui se situent au sommet des villosités (Davidson et al., 1975). Il s'agit des cellules épithéliales les plus différenciées, non prolifératives et spécialisées dans la digestion et l'absorption des nutriments.

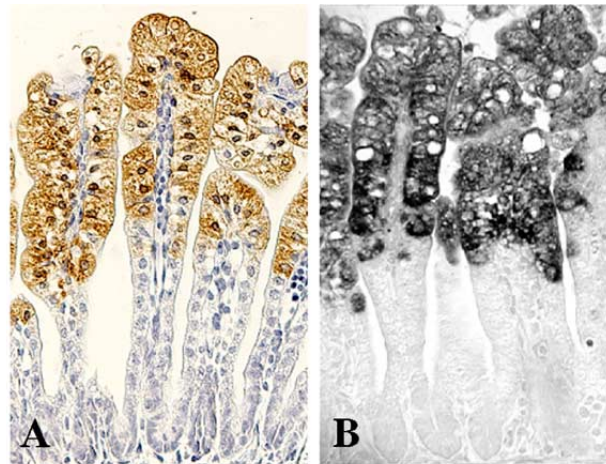


Figure 27. Tropisme du rotavirus pour les entérocytes matures de l'épithélium intestinal (Boshuizen et al., 2005).

Les protéines du rotavirus (A) ainsi que les ARN viraux (B) ont été détectés respectivement par immunohistochimie et hybridation *in situ* sur des coupes d'iléon de souris sacrifiées 24 heures après le début de l'infection par la souche de rotavirus EDIM. Les cellules marquées positivement sont situées au sommet des villosités intestinales, correspondant à des cellules parfaitement différenciées en entérocytes.

Les mécanismes par lesquels l'infection à rotavirus induit la diarrhée sont multiples (Ramig, 2004). L'un d'entre eux est la diminution de la capacité d'absorption de l'épithélium, dû à l'altération des fonctions entérocytaires. Cela conduit à un milieu hyperosmotique dans la lumière intestinale, induisant une fuite de fluides, correspondant à une diarrhée osmotique.

La diarrhée induite par l'infection à rotavirus est aussi une diarrhée de type sécrétoire. La protéine virale NSP4 est clivée, sécrétée dans le milieu extracellulaire et agit de manière paracrine comme une entérotoxine (Zhang et al., 2000). Dans les cellules des cryptes, qui sont responsables des fonctions de sécrétion, l'action paracrine de NSP4 induit une sécrétion de Cl^- , ce qui contribue à l'augmentation de la force osmotique au niveau de la lumière intestinale (Morris et al., 1999). D'autre part, l'activation du système nerveux entérique lors de l'infection expliquerait pourquoi l'infection des entérocytes au sommet des villosités provoque une sécrétion massive de Cl^- et d'eau par les cellules de la crypte (Kordasti et al., 2004).

5.2. Génome et structure du rotavirus

5.2.1. Génome viral

Comme tous les virus de la famille des *Reoviridae*, le génome du rotavirus est segmenté et formé d'ARN bicaténaire. La taille totale du matériel génétique est d'environ 18,5kb répartis en 11 segments d'ARNdb coiffés à l'extrémité 5' (Imai et al., 1983) et non polyadénylés à l'extrémité 3' (McCrae and McCorquodale, 1983). Chaque segment code pour une protéine, à l'exception du segment 11 qui permet la synthèse de deux protéines à partir de deux cadres ouverts de lecture (Mattion et al., 1991). Dans les régions non codantes en 5' et 3' qui encadrent la région codante, on retrouve : d'une part, des séquences consensus communes à tous les segments, qui permettent leur transcription et leur réplication par la même polymérase virale et d'autre part, des séquences spécifiques de chaque segment, qui permettent l'encapsulation d'une seule copie des 11 segments dans la capside (Li et al., 2010).

Le génome du rotavirus code ainsi douze protéines : six protéines structurales VP (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 et VP7) et six protéines non structurales NSP (NSP1 à NSP6). Les protéines structurales sont celles qui forment le virion, tandis que les protéines non structurales ne sont pas présentes dans le virion mais sont impliquées dans la morphogénèse virale.

5.2.2. Structure des virions

La structure du virion du rotavirus ainsi que celles des intermédiaires d'assemblage ont été résolues par de nombreuses études utilisant la cristallographie à rayons X et la reconstitution à partir d'images de cryomicroscopie (Trask et al., 2012) (**Fig 28**).

La capside du rotavirus est composée de trois couches protéiques concentriques. Au cours de l'assemblage du rotavirus, on distingue trois types de particules virales.

- Les particules à simple couche (SLP pour « *Single layered particles* » ou *core*), formées du génome encapsidé dans la couche interne de la capside.
- Les particules à double couche (DLP pour « *Double layered particles* »), ayant acquis en plus la couche intermédiaire de la capside.
- Les particules à triple couche (TLP pour « *Triple layered particles* »), qui sont la forme mature et infectieuse des virions.

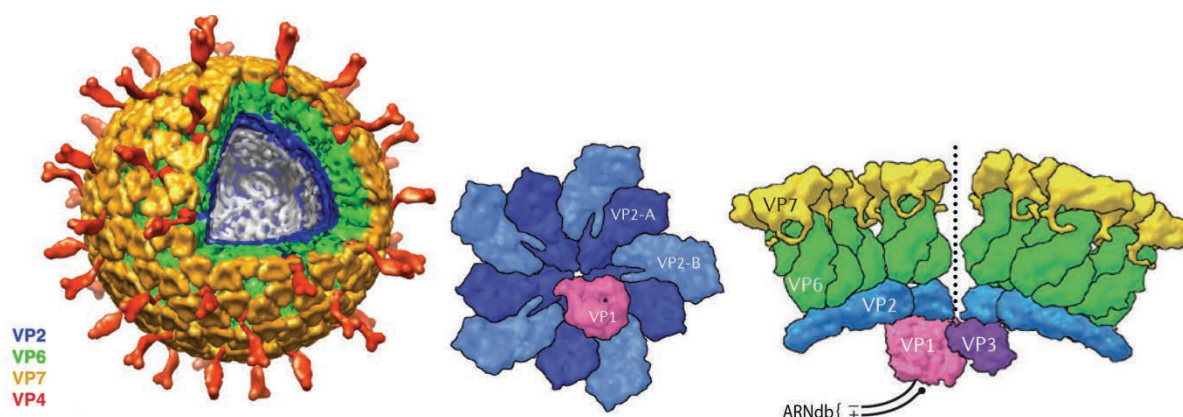


Fig 28. Structure du rotavirus (selon McClain et al., 2010; Trask et al., 2012)

A. Structure du virion complet, reconstituée à partir de données de cryomicroscopie. L'intérieur de la capside, qui comporte le génome viral associé au complexe VP1/VP3 n'est pas présenté. VP2 (*en bleu*) et VP6 (*en vert*) forment respectivement les couches interne et intermédiaire de la capside. Les deux protéines de la couche externe de la capside sont VP7 (*en jaune*) et VP4 (*en rouge*). La coupe transversale montre que la base de VP4 est profondément enfouie jusque dans la couche intermédiaire.

B. Organisation d'un décimère de VP2. Deux types de monomères, VP2-A (*en bleu foncé*) et VP2-B (*en bleu clair*), occupent des positions légèrement différentes autour de l'axe de symétrie d'ordre 5. La couche interne de la capside est formée de 12 assemblages de ce type. Chaque décimère de VP2 est associé à une molécule de VP1 (*en rose*) et une molécule de VP3 (non montrée).

C. Coupe transversale montrant la position des trimères de VP7 sur chaque trimère de VP6 (VP4 n'est pas montrée) et le canal formé par la partie N-terminale des molécules de VP2, positionné le long de chaque axe de symétrie d'ordre 5, indiqué par la ligne en pointillés. Il a été suggéré que les ARN (+) viraux sortiraient par ces canaux pour être traduits dans le cytoplasme de la cellule hôte.

La couche interne de la capside est formée de 120 molécules de VP2 (McClain et al., 2010). Un décimère de VP2 occupe chacun des douze sommets de l'icosaèdre, autour des axes de symétrie d'ordre 5 (les 6 axes de symétrie qui relient deux sommets opposés d'un icosaèdre) (**Fig 28B**). Dans chaque décimère, la partie N-terminale des molécules de VP2 se projette vers l'intérieur de la capside et est supposée former un canal le long de l'axe de symétrie d'ordre 5 (**Fig 28C**). Le complexe réplcatif viral est formé de VP1, la polymérase virale (Valenzuela et al., 1991) et de VP3, l'enzyme qui ajoute la coiffe à l'extrémité 5' des ARN (+) (Chen et al., 1999). Il y a 11 complexes VP1/VP3, chacun associé à un exemplaire des 11 segments d'ARNdb du génome, avec éventuellement un complexe VP1/VP3 supplémentaire non associé à l'ARN (Prasad et al., 1996; Estrozi and Navaza, 2010; McClain et al., 2010). Ils occupent les 11 (ou 12) sommets de la capside interne icosaédrique. Lors de l'étape de transcription du génome viral (*cf* § 5.4.2 p87), les brins d'ARN (+) synthétisés par

VP1 sortent du *core* via les canaux formés par la partie N-terminale de VP2 afin d'être traduits dans le cytoplasme de la cellule hôte (McClain et al., 2010).

Deux cent soixante trimères de VP6 (Mathieu et al., 2001; McClain et al., 2010) et 260 trimères de VP7 (Chen et al., 2009) forment respectivement les couches intermédiaire et externe de la capside. Chaque trimère de VP7 est posé sur chaque trimère de VP6, formant ainsi une capside perforée (Chen et al., 2009) (**Fig 28C**). La stabilité de la couche VP7 dépend de la liaison des ions Ca^{2+} (2 ions Ca^{2+} par molécule de VP7) (Aoki et al., 2009).

De la couche VP7, se projettent 60 spicules formés par 60 trimères de VP4 (Prasad et al., 1990), grâce auxquelles les virions s'attachent aux récepteurs cellulaires et pénètrent dans la cellule hôte (*cf* § 5.4.1 p86). La base des trimères de VP4 est profondément enfoncée dans la couche intermédiaire (composée de VP6) de la capside (**Fig 28A**).

5.3. Modèles cellulaires pour étudier le rotavirus

Les cellules les plus couramment utilisées pour cultiver et étudier le rotavirus sont les cellules MA104, qui sont des cellules épithéliales de rein de singe vert (*Cercopithecus aethiops*). Ces cellules demeurent cependant éloignées des cellules cibles naturelles de ce virus, qui sont les entérocytes différenciés de l'intestin grêle, tant au niveau morphologique (non polarisées) que fonctionnel.

Les cellules humaines Caco-2, issues d'un adénocarcinome colique, se différencient spontanément en culture après avoir atteint la confluence et expriment des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des entérocytes matures telles que la présence d'une bordure en brosse, où sont localisées des hydrolases intestinales comme la saccharase-isomaltase (SI) ou la dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) (Chantret et al., 1988). Pour ces raisons, les cellules Caco-2 constituent un modèle *enterocyte-like* de choix pour étudier les interactions entre les pathogènes et l'épithélium intestinal. Il est d'ailleurs à souligner que dans ces cellules intestinales, la morphogénèse du rotavirus diffère radicalement de celle observée dans les cellules MA104 concernant l'étape de sortie des virions (*cf* § 5.4.6 p94)

5.4. Cycle réplicatif du rotavirus

Une vue d'ensemble du cycle réplicatif du rotavirus est présentée dans la figure 29. Chaque étape sera détaillée dans les paragraphes qui suivent, et certains événements seront illustrés par une figure plus détaillée. Une attention particulière sera portée aux étapes tardives de la morphogénèse virale, qui sont l'acquisition des deux protéines de la couche externe de la

capside (VP7 et VP4), ainsi que la sortie des virions de la cellule hôte. Enfin, le rôle de la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} , dans plusieurs étapes de la morphogénèse virale, sera présenté.

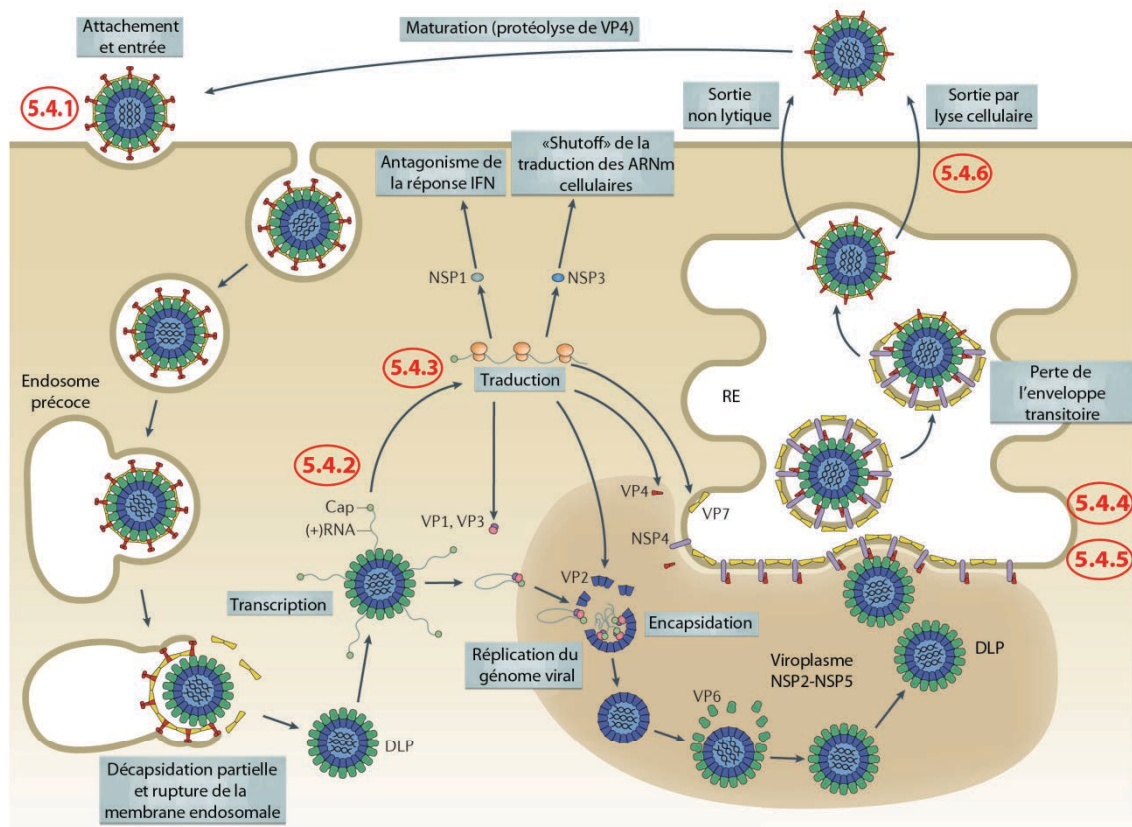


Figure 29. Cycle réplcatif du rotavirus (selon Trask et al., 2012)

Le cycle viral est décrit dans le texte. La numérotation (*en rouge, entourée*) des étapes de la morphogénèse virale correspond à celle des paragraphes ci-dessous. Cette figure illustre le modèle selon lequel la protéine de spicule VP4 serait acquise lors du bourgeonnement des DLP dans le RE. Un autre modèle d'acquisition de VP4, qui a lieu dans une étape post-réticulaire, est discuté dans le §5.4.5 (p92) du texte.

5.4.1. Entrée et décapsidation partielle

A la différence de l'entrée des virus enveloppés dans leur cellule hôte qui implique des événements de fusion membranaires, les virus non enveloppés doivent franchir les membranes cellulaires pour atteindre le cytoplasme. Dans le cas du rotavirus, on ne sait pas encore clairement si la membrane cellulaire franchie est la membrane plasmique ou la membrane de l'endosome après l'endocytose des virions. Le modèle d'entrée par endocytose puis perméabilisation de la membrane endosomale rassemble cependant plus de preuves

directes (Sanchez-San Martin et al., 2004; Gutierrez et al., 2010; Wolf et al., 2012; Silva-Ayala et al., 2013).

La protéine de spicule VP4 est le principal acteur qui permet à la fois l'attachement (ou l'adsorption) des virions à la surface de la cellule hôte et la perméabilisation de la membrane de l'endosome, permettant la libération des virus endocytés dans le cytoplasme de la cellule hôte. L'infection nécessite le clivage de VP4 par la trypsine, présente *in vivo* dans la lumière intestinale (Estes et al., 1981). Ce clivage ferait que les spicules passent d'une conformation flexible à une conformation ordonnée nécessaire à leur fonction dans l'étape d'entrée (Crawford et al., 2001). L'attachement des virions à la surface de la cellule hôte, ainsi que les étapes post-attachement engageraient plusieurs récepteurs cellulaires enrichis dans les microdomaines membranaires de type raft tels que les intégrines et les acides sialiques présents sur les glycoprotéines et glycolipides, et qui interviendraient de manière séquentielle (López and Arias, 2004).

Les données structurales et biochimiques ont proposé un modèle selon lequel les changements conformationnels des spicules VP4 permettent l'exposition d'un peptide fusogène et la rupture des membranes cellulaires (Dormitzer et al., 2001, 2004; Kim et al., 2010). VP7 serait le principal élément influençant la fonction fusogène de VP4. La couche VP7 stabiliserait VP4 dans la conformation « redressée », nécessaire à l'attachement des virions à la surface cellulaire (Settembre et al., 2011). La stabilité des trimères de VP7 étant dépendante de la liaison des ions Ca^{2+} (Aoki et al., 2009), la faible concentration en Ca^{2+} dans les endosomes provoque la dissolution de la couche externe de la capsid (décapsidation partielle) (Ludert et al., 1987; Chemello et al., 2002). L'absence de VP7 induirait des changements conformationnels de VP4 permettant la rupture de la membrane de l'endosome et le relargage des virions dans le cytoplasme. D'ailleurs, la forme de VP7 non associée aux virions perméabilise aussi les membranes *in vitro*, ce qui suggère que VP7 pourrait aussi contribuer à la perméabilisation de la membrane de l'endosome (Charpilienne et al., 1997).

5.4.2. Synthèse et traduction des ARNm viraux

VP1, la polymérase virale, est une ARN polymérase ARN dépendante (Valenzuela et al., 1991). La perte de la couche externe de la capsid entraîne des changements conformationnels des couches intermédiaire (VP6) et interne (VP2), ce qui constituerait un *switch* activant VP1 et permettant la synthèse des brins ARN (+) à partir des brins ARN négatifs (ARN (-)) du génome (Libersou et al., 2008; Chen et al., 2009). On parle d'activité

transcriptase de VP1, car une partie du pool d'ARN (+) synthétisé jouera le rôle d'ARNm viraux, tandis que l'autre partie constituera le génome des nouveaux virions (*cf* § 5.4.3 p89). VP3, qui est associée à VP1, ajoute une coiffe à l'extrémité 5' des brins ARN (+) (Chen et al., 1999). Les données structurales ont montré qu'en absence de la couche externe de la capside, les canaux situés le long des axes de symétrie d'ordre 5 adoptent une conformation dilatée, ce qui permet non seulement l'afflux de nucléotides nécessaires à la synthèse des ARN (+), mais aussi la sortie de ces derniers vers le cytoplasme (Libersou et al., 2008; Chen et al., 2009) (*cf* §5.2.2 p83).

Tous les ARNm viraux sont traduits par les ribosomes dans le cytoplasme, sauf ceux codant pour les glycoprotéines VP7 et NSP4 qui sont traduits par les ribosomes associés à la membrane du RE (*cf* §5.4.4 p90). La protéine NSP3 détourne la machinerie de traduction cellulaire vers la traduction des ARNm viraux (**Fig 30**). La traduction efficace des ARNm cellulaires nécessite la formation de structures pseudo-circulaires grâce au rapprochement des extrémités 3' et 5' de l'ARNm. Cela repose sur l'interaction du facteur d'initiation de la traduction *eukaryotic Initiation Factor 4G* (eIF4G), qui se lie à la coiffe en 5', avec la *PolyA-binding protein* (PABP) qui recouvre la queue poly A en 3' (Mangus et al., 2003). Quant aux ARNm viraux, ils possèdent une coiffe en 5' (Imai et al., 1983) mais pas de queue poly A en 3' (McCrae and McCorquodale, 1983). La protéine virale NSP3 joue un rôle similaire à celui de la PABP : d'une part, elle se lie à la séquence consensus 5'-UGACC-3' à l'extrémité 3' des ARNm viraux *via* son domaine N-terminal (Poncet et al., 1994) ; d'autre part, elle interagit avec eIF4G *via* son domaine C-terminal (Piron et al., 1998, 1999). En déplaçant la PABP de eIF4G, NSP3 dirige la machinerie cellulaire vers la traduction des ARNm viraux et provoque une inhibition générale (ou *shutoff*) de la traduction des ARNm cellulaires.

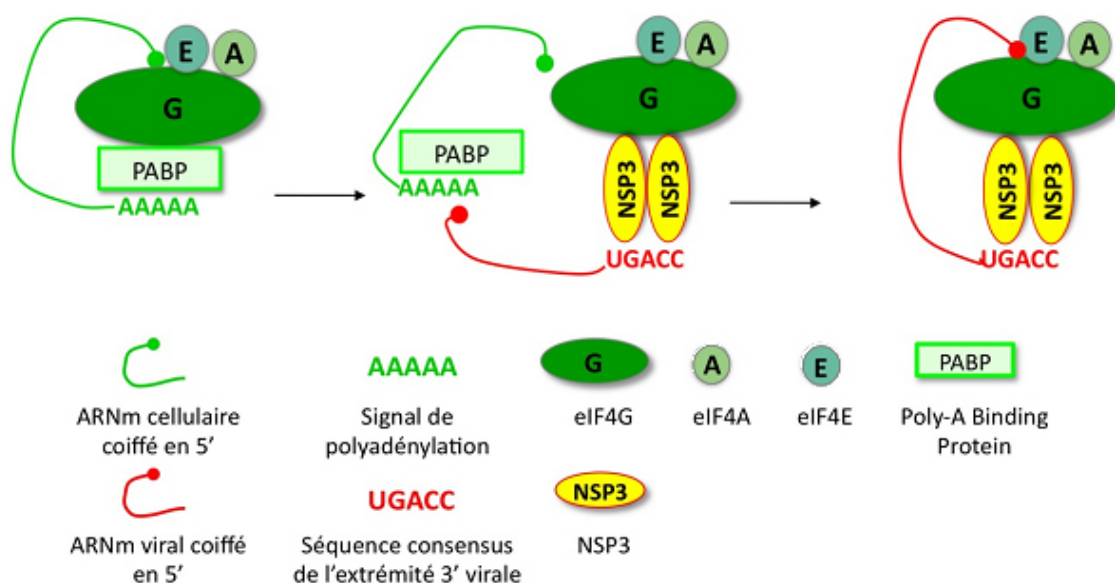


Figure 30. Similarité fonctionnelle entre la protéine virale NSP3 et la protéine cellulaire PABP

5.4.3. Réplication du génome et début d'assemblage des virions (jusqu'au stade DLP)

La réplication du génome viral, c'est-à-dire la synthèse de l'ARNdb à partir de l'ARN (+) comme matrice, ainsi que le début d'assemblage des virions, ont lieu au sein de structures particulières appelées viroplasmes ou « usines virales » (Estes). Ces structures, qui apparaissent au microscope électronique sous forme d'inclusions cytoplasmiques denses en électrons et dépourvues de membrane, sont des sites de concentration de l'ARN viral et des protéines structurales VP1, VP3, VP2 et VP6, qui ensemble vont s'assembler en DLP (Petrie et al., 1982, 1984). Les protéines cellulaires associées aux viroplasmes n'avaient pas été caractérisées jusqu'à récemment (voir le chapitre I de la section Résultats p100).

La formation des viroplasmes est initiée très tôt au cours de l'infection par deux protéines non structurales, NSP2 et NSP5 (Fabbretti et al., 1999; Contin et al., 2010). Les interactions complexes protéines-protéines et protéines-ARN au sein des viroplasmes régulent et coordonnent les processus de réplication du génome viral et d'assemblage de la capsid (Berois et al., 2003; Vende et al., 2003). Par ailleurs, NSP2 est directement impliquée dans l'encapsidation du génome viral probablement (i) en étant un moteur moléculaire de l'encapsidation grâce à l'énergie qui résulte de son activité nucléoside triphosphatase (Taraporewala et al., 1999) et (ii) en défaisant les structures secondaires dans les brins ARN (+) avant leur encapsidation (Taraporewala and Patton, 2001).

Selon le modèle actuel, les 11 brins d'ARN (+) seraient encapsidés avec le complexe VP1/VP3 dans la couche interne de la capsid (VP2) avant d'être répliqués par VP1 en 11 segments d'ARNdb (Silvestri et al., 2004) (**Fig 31**). VP1 reconnaît une séquence consensus située en 3' des ARN (+) et forme 11 complexes différents avec les 11 brins ARN (+) (Lu et al., 2008; Patton, 1996). A ce stade, VP1 est inactif. L'assemblage de VP2 autour du complexe VP1/VP3 – ARN (+) stimule l'activité réplicase de VP1, initiant la synthèse du brin ARN (-).

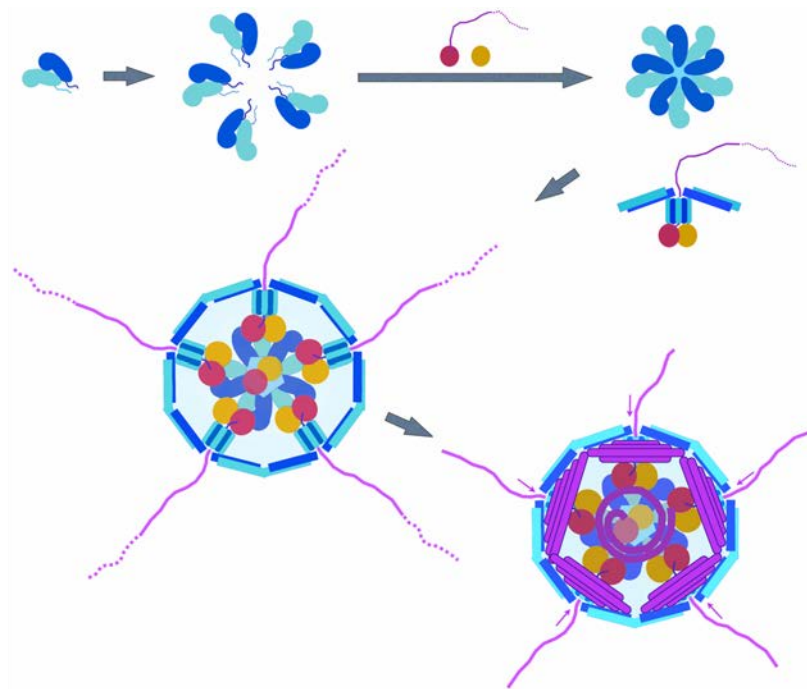


Figure 31. Modèle d'assemblage des DLP dans les viroplasmes (selon McClain et al., 2010)

VP1 (*en rouge*) s'associe à VP3 (*en jaune*) et à l'ARN (+) viral (*en violet*). Cinq dimères de VP2, chacun formé d'un monomère VP2-A (*en bleu foncé*) et VP2-B (*en bleu clair*), rejoignent le complexe VP1-VP3 – ARN (+) pour former l'unité d'assemblage fondamentale. Douze unités d'assemblage de ce type, chacune comportant un segment d'ARN (+) différent, sauf une qui ne comporte aucun ARN, s'assemblent pour donner le *core* du virion, au sein duquel se fait la synthèse du brin ARN (-). L'ARNdb viral est finement organisé dans le *core* (structures compactes en violet, les brins ARN (+) et (-) étant représentés par une même couleur). L'assemblage de VP6 sur le *core* n'est pas montré.

5.4.4. Bourgeonnement des DLP dans le RE et acquisition de VP7

Les DLP, assemblés dans les viroplasmes, sortiront ensuite de ces inclusions cytoplasmiques pour poursuivre leur morphogénèse dans le RE, en l'occurrence acquérir la protéine VP7 de la couche externe de la capsid. Le bourgeonnement dans les compartiments endomembranaires est rarement observé dans la morphogénèse des virus non enveloppés, qui

généralement se passe dans le cytoplasme. La compartimentation de VP7 dans le RE aurait probablement pour rôle d'éviter l'assemblage précoce de VP7 sur les DLP. Si lors de l'étape d'entrée des virions la perte de la couche externe de la capsid permet l'activation de l'activité transcriptase de VP1, l'assemblage précoce de VP7 sur les DLP pourrait inhiber l'activité réplicase de VP1, compromettant la synthèse du brin ARN (-) (Chen et al., 2009; Libersou et al., 2008).

Des 12 protéines structurales et non structurales du rotavirus, seules NSP4 et VP7 sont synthétisées par les ribosomes associés à la membrane du RE. NSP4 est une protéine intégrale de la membrane du RE, formant des oligomères, ce qui est crucial pour son activité en tant que viroporine, une classe de protéines virales qui forment des canaux dans les membranes et perturbent l'homéostasie ionique (Hyser et al., 2010). VP7, quant à elle, n'est pas une protéine intégrale mais une protéine associée à la membrane du RE. Il est connu que VP7 reste associée, du côté de la lumière du RE, au peptide signal en N-terminal qui a permis sa translocation (Stirzaker and Both, 1989; Clarke et al., 1995). Cependant, la topologie exacte de VP7 n'est pas clairement établie.

Via sa partie cytosolique, NSP4 interagit avec VP6 et joue rôle de récepteur des DLP sortant des viroplasmes et bourgeonnant dans le RE (O'Brien et al., 2000). Au cours de ce bourgeonnement, les DLP acquièrent une enveloppe transitoire. Cette dernière sera par la suite dissoute, probablement grâce à l'activité de perméabilisation des membranes de VP7 et de NSP4, tel qu'il a été observé *in vitro* (Browne et al., 2000; Charpilienne et al., 1997). Par un mécanisme totalement inconnu, VP7, qui était associée à l'enveloppe transitoire, s'assemble sur les DLP. L'intégrité de la couche VP7 acquise par les DLP dépend de la concentration en Ca^{2+} dans le RE (Ruiz et al., 2007).

Implication de la machinerie réticulaire de repliement des protéines

Les étapes complexes la morphogénèse du rotavirus dans le RE (bourgeonnement et assemblage) impliquent l'assistance de la machinerie cellulaire de repliement des protéines dans ce compartiment. Il a été observé que l'expression des chaperonnes BiP/GRP78 et Endoplasmine/GRP94 augmentait dans les cellules infectées (Xu et al., 1998). BiP/GRP78, CNX, CRT et PDI sont requis pour la morphogénèse virale, tandis que Endoplasmine/GRP94 et ERp57 ne le seraient pas (Maruri-Avidal et al., 2008). De nombreuses chaperonnes et enzymes de repliement interagissent avec VP7 et NSP4 (Xu et al., 1998; Mirazimi and Svensson, 1998; Mirazimi et al., 1998). La formation des ponts disulfures intramoléculaires dans VP7, ainsi que la glycosylation de VP7 et de NSP4 sont importantes pour l'assemblage

intra-réticulaire du rotavirus. Ainsi, les drogues chimiques comme le DTT (qui provoque la réduction des ponts disulfures), la tunicamycine (qui inhibe la glycosylation des protéines) ou la Brefeldine A (qui provoque le collapsus de l'appareil de Golgi vers le RE, entraînant la modification de l'état de glycosylation de VP7 et de NSP4 par les enzymes golgiennes), conduisent à l'accumulation de particules immatures enveloppées dans le RE (Svensson et al., 1994; Delmas et al., 2004; Mirazimi et al., 1996). La concentration en Ca^{2+} dans le RE, qui stabilise la couche VP7 (Michelangeli et al., 1995; Ruiz et al., 2007), aurait aussi un impact indirect sur la morphogénèse virale *via* la régulation du fonctionnement des chaperonnes.

Ces nombreux travaux ont mis en évidence l'importance des chaperonnes et enzymes de repliement réticulaires dans l'assemblage du rotavirus (i) de manière globale, comme par exemple en montrant l'impact négatif des drogues qui perturbent le repliement des protéines et celui du *knock-down* d'une chaperonne/enzyme de repliement sur la production virale, ou (ii) de manière ciblée sur la relation repliement-fonction des protéines virales NSP4 et VP7 qui sont associées au RE. Cependant, la participation des chaperonnes et enzymes de repliement dans le processus d'assemblage lui-même, c'est-à-dire l'interaction avec les intermédiaires d'assemblage, n'a pas encore été étudiée (voir le chapitre I de la section Résultats p100).

5.4.5. Acquisition de la protéine de spicule VP4 : deux modèles contradictoires

Actuellement, l'ordre d'acquisition de VP4 et de VP7, ainsi que le site d'acquisition de VP4, restent en débat.

VP4 est une protéine cytosolique, qui, dans les cellules Caco-2 polarisées, est localisée principalement à la membrane apicale, cela dès les temps précoces de l'infection et indépendamment des autres protéines virales (Sapin et al., 2002; Delmas et al., 2004; Gardet et al., 2006). La localisation apicale de VP4 repose sur : (i) son association aux microdomaines lipidiques de type rafts, enrichis à la membrane apicale des cellules épithéliales polarisées (Sapin et al., 2002; Delmas et al., 2004) et (ii) son association au cytosquelette d'actine de la bordure en brosse (Gardet et al., 2006, 2007). Il est probable que la présence de VP4 dans les rafts soit directement dépendante de son association avec le cytosquelette d'actine, ce dernier interagissant avec les composants lipidiques et protéiques des rafts au niveau de la membrane apicale (Chichili and Rodgers, 2009). Plus tard au cours de l'infection, les particules infectieuses sont elles aussi adressées vers la membrane apicale (Jourdan et al., 1997) grâce à leur association avec les rafts (Sapin et al., 2002). A partir de

ces données, il a été proposé un modèle selon lequel les particules ayant acquis VP7 ressortent du RE pour acquérir VP4 au niveau d'un site extra-réticulaire qui pourrait être la membrane apicale. Ce modèle rend compte du fait que les néovirions sont relargués de manière polarisée au niveau du pôle apical des cellules Caco-2 (Jourdan et al., 1997), et que les rafts (Sapin, 2002 ; Cuadras, 2003) et le mouvement de VP4 sur le cytosquelette d'actine (Gardet et al., 2007) ont un rôle fonctionnel dans la sortie polarisée des virions des cellules Caco-2. D'ailleurs, aux temps tardifs de l'infection, VP4 s'accumule en quantité suffisante pour désorganiser le cytosquelette d'actine de la bordure en brosse, ce qui faciliterait le relargage des virions (Gardet et al., 2006).

D'autres observations soutiennent ce modèle d'assemblage post-réticulaire de VP4 sur les virions. Dans les cellules Caco-2, le traitement par la tunicamycine (qui inhibe la glycosylation des protéines) bloque la maturation des virions au stade de particules enveloppées dans le RE sans affecter l'association de VP4 aux rafts ni son trafic vers la membrane apicale, ce qui suggère que VP4 serait assemblée sur les virions dans une étape post-réticulaire (Delmas et al., 2004). Déctor et collègues ont isolé des particules contenant VP7 mais sans VP4, produites dans des cellules MA104 transfectées par un siRNA dirigé contre VP4. Cela suggère que l'acquisition de VP4 ne serait pas un prérequis à la sortie du RE des virions (Déctor et al., 2002). D'un point de vue structural, l'assemblage de VP4 sur les particules ayant acquis VP7 confère aux virions une structure plus compacte (Déctor et al., 2002).

Cependant, un autre faisceau de données propose que VP4 serait acquise avant VP7, lors du bourgeonnement des DLP dans le RE (**Fig 29**). Des études d'imagerie ont localisé VP4 dans le RE (Petrie et al., 1984; Poruchynsky and Atkinson, 1991; González et al., 2000). VP4 serait recrutée au niveau de la face cytoplasmique de la membrane du RE *via* l'interaction avec NSP4 (Au et al., 1993). L'assemblage de VP4 sur les DLP pourrait ainsi avoir lieu juste avant ou au cours du bourgeonnement du complexe DLP – NSP4 – VP4 dans le RE. Quand l'expression de VP4 est inhibée par ARN interférence, les particules virales s'accumulent dans le RE, ce qui suggère, à la différence des observations de Déctor et ses collègues (Déctor et al., 2002), que VP4 serait un prérequis à la sortie du RE des virions (Cuadras et al., 2006). Selon ce modèle, il existerait donc deux pools distincts de VP4 dans les cellules infectées : (i) le pool de VP4 localisé à proximité du RE, qui serait ensuite assemblé sur les DLP, et (ii) le pool de VP4 associé au cytosquelette d'actine et aux rafts (dans les cellules Caco-2 polarisées, ce deuxième pool est localisé à la membrane apicale).

Si ce deuxième modèle est remis en question par le fait que certaines études n'ont pas détecté VP4 dans le RE des cellules Caco-2 infectées (Delmas et al., 2004; Jourdan et al., 1997), il est favorisé par plusieurs données structurales. Selon la structure des virions observée en cryomicroscopie, la base du spicule VP4 est trop volumineuse pour être insérée dans les espaces entre les molécules de VP7 si celles-ci étaient déjà assemblées sur les DLP (Settembre et al., 2011). L'assemblage *in vitro* de la couche externe de la capside sur les DLP nécessite l'ajout de VP4 avant VP7 pour produire des particules infectieuses, l'ordre inverse excluant VP4 de l'assemblage (Trask and Dormitzer, 2006).

5.4.6. Sortie des virions de la cellule hôte : sortie lytique *versus* non lytique

Dans les cellules MA104, les virions seraient retenus dans le RE jusqu'à ce que la cellule hôte soit lysée, relarguant ainsi les virions dans le milieu extracellulaire (Musalem and Espejo, 1985). Bien que les éléments qui induisent la lyse cellulaire ne soient pas bien compris, il s'agirait de l'augmentation de la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} induite par l'infection (Pérez et al., 1998).

Cependant, comme mentionné précédemment, les cellules MA104 sont éloignées des cellules cibles naturelles du rotavirus tant au niveau morphologique que fonctionnel. Dans les entérocytes d'enfants infectés ou dans des modèles animaux d'infection par le rotavirus, il ne semble pas exister de lyse cellulaire, du moins dans les premiers jours de l'infection (voir **Fig 27**) (Boshuizen et al., 2005; Guérin-Danan et al., 2001). Dans le modèle de cellules épithéliales intestinales polarisées Caco-2, l'effet cytopathique n'est observé que tardivement, après que les virions soient relargués, ce qui suggère que les virions sortent de la cellule hôte sans induire de lyse cellulaire (Svensson et al., 1991; Halasz et al., 2010). Jourdan et collègues ont d'ailleurs montré que les virions sont sécrétés de manière polarisée au niveau du pôle apical, par une voie de trafic non conventionnelle qui ne passe pas par l'appareil de Golgi et sans lyse cellulaire (Jourdan et al., 1997). La conclusion selon laquelle cette voie de trafic non conventionnelle serait une sécrétion atypique provient de la seule observation, en microscopie électronique, de virions dans des vésicules proches de la membrane apicale. Cependant, aucun événement de fusion n'a pu être visualisé, et il n'y a pas d'informations sur l'identité de ces vésicules contenant les virions. De ce fait, sachant que VP7 et VP4 peuvent toutes deux perméabiliser les membranes *in vitro* (cf §5.4.1 p86), il est possible que les virions matures ne sortent pas par le biais d'une sécrétion, mais par franchissement de la membrane plasmique sans provoquer de lyse cellulaire.

La combinaison des données sur les mécanismes de sortie des virions et celles sur les mécanismes d'acquisition de la protéine de spicule VP4 a permis d'émettre plusieurs modèles possibles concernant l'étape tardive post-réticulaire de la morphogénèse du rotavirus dans les cellules Caco-2, qui restent à conforter.

- VP4 s'associe avec les rafts et le cytosquelette d'actine à la membrane apicale, indépendamment des autres protéines virales. Les virions ayant acquis VP7 ressortent du RE et, par une voie de trafic pour l'instant inconnue qui ne passe pas par l'appareil de Golgi, rejoignent la membrane apicale, où ils acquièrent VP4, puis sortent de la cellule hôte. Dans ce modèle, le relargage polarisé des virions au pôle apical repose sur la localisation apicale de VP4 (au préalable de son assemblage sur les virions).
- La population de rafts qui contient VP4 et qui servirait de plateforme d'assemblage des virions pourrait provenir de vésicules/structures membranaires intracellulaires, en route vers la membrane apicale. Dans les cellules de mammifères, il est généralement admis que les rafts se forment à partir de l'appareil de Golgi (Meer and Lisman, 2002). On peut alors envisager que VP4 s'associe aux rafts des membranes intracellulaires dérivant de l'appareil de Golgi, cela hors de l'appareil de Golgi lui-même, vu que VP4 est absent de ce compartiment. Les virions ayant acquis VP7 sortent du RE et rejoignent VP4 au niveau de ces plateformes rafts, puis sont dirigés vers la membrane apicale. L'association des protéines aux rafts est connue comme un signal qui contribue à l'adressage apical (Rodriguez-Boulan and Müsch, 2005). D'ailleurs, il est intéressant de noter que VP4 possède un domaine dont le repliement est similaire au domaine de liaison aux hydrates de carbones des galectines, une famille de lectine liant les β -galactosides (Dormitzer et al., 2002), qui sont des protéines cytosoliques secrétées de manière non conventionnelle selon une voie de trafic qui ne passe pas par l'appareil de Golgi (Hughes, 1999).
- VP4 est acquis lors du bourgeonnement des DLP dans le RE. Les particules matures (ayant acquis VP7 et VP4) ressortent du RE, puis sont dirigées vers la membrane apicale probablement grâce à l'association de VP4 aux rafts.

Que VP4 soit acquise dans une étape post-réticulaire, ou qu'elle soit déjà acquise lors du bourgeonnement des DLPs dans le RE, il reste à déterminer : (i) comment les virions sortent du RE et (ii) comment ils atteignent la membrane apicale sans passer par l'appareil de

Golgi. La première question s'applique aussi aux cellules MA104 d'où les virions sortent par lyse cellulaire, car si VP4 est assemblée sur les virions dans une étape post-réticulaire, quel que soit le mode de sortie des virions (lytique *versus* non lytique), les particules virales doivent ressortir du RE.

5.4.7. Rôle de la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} dans la morphogénèse virale

L'infection à rotavirus induit une augmentation de la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+} \text{ (cyto)}]$), qui est non seulement cruciale pour la morphogénèse virale, mais intervient également dans les mécanismes complexes d'induction de la diarrhée (Michelangeli et al., 1991; Ruiz et al., 2000). L'augmentation nette de la $[\text{Ca}^{2+} \text{ (cyto)}]$ dans les cellules infectées provient de l'efflux de Ca^{2+} du RE vers le cytoplasme et de l'influx de Ca^{2+} provenant du milieu extracellulaire. Le fragment (112-175) de NSP4 est sécrété et agit comme une entérotoxine virale, activant la phospholipase C, produisant le messenger secondaire IP3 qui se lie à son récepteur IP3R à la membrane du RE, ce qui provoque le relargage de Ca^{2+} du RE (Dong et al., 1997; Zhang et al., 2000). Quant à la forme de NSP4 à la membrane du RE, elle provoque l'efflux calcique du RE en agissant comme une viroporine, une classe de protéines virales capables de former des canaux dans les membranes (Hyser et al., 2010). Il se pourrait que NSP4 forme également un tel canal ionique à la membrane plasmique, par lequel aurait lieu l'influx de Ca^{2+} (Ruiz et al., 2005). Par ailleurs, la déplétion du réservoir réticulaire en Ca^{2+} induit l'activation des canaux calciques situés à la membrane plasmique, par le mécanisme appelé *Store-Operated Calcium Entry* (Díaz et al., 2012; Hyser et al., 2013).

L'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+} \text{ (cyto)}]$ intervient dans différentes étapes de la morphogénèse virale. Premièrement, elle régulerait la formation des viroplasmes *via* l'induction de l'agrégation de NSP5, composant clef des viroplasmes et qui possède des sites de liaison aux ions Ca^{2+} (Sen et al., 2007). Deuxièmement, la $[\text{Ca}^{2+} \text{ (cyto)}]$ élevée induit la formation de structures punctiformes par NSP4, qui seraient des protrusions de la membrane du RE, enveloppant les viroplasmes afin de faciliter le bourgeonnement des DLP dans le RE (Berkova et al., 2006; Hyser et al., 2010; Crawford et al., 2012).

5.5. Modulation de l'UPR et de l'autophagie par le rotavirus

5.5.1. Rotavirus et UPR

Il a été montré que le rotavirus induit le stress du RE et active les voies IRE1, ATF6 (Trujillo-Alonso et al., 2011) et probablement aussi la voie PERK de l'UPR (Zambrano et al.,

2011). Cependant, la mise en place de l'UPR serait bloquée par différents mécanismes: (i) d'une part, dû aux modifications morphologiques du RE, les senseurs de l'UPR seraient recrutés au niveau des viroplasmes qui sont proches du RE ; (ii) d'autre part, les effecteurs de l'UPR qui sont dans le cytoplasme comme CHOP, GADD34, Nrf2, seraient aussi séquestrés dans les viroplasmes selon un mécanisme pour l'instant inconnu (Zambrano et al., 2011). Trujillo et collègues ont également évoqué un blocage de l'UPR au niveau traductionnel dû au *shutoff* général de la traduction des ARNm cellulaires provoqué par la protéine virale NSP3 (cf §5.4.2 p87) (Trujillo-Alonso et al., 2011). Ces études n'ont cependant pas évalué l'impact de l'UPR sur la morphogénèse virale, qui sera discutée dans la première partie de mes travaux (voir le chapitre I de la section Résultats p100).

5.5.2. Rotavirus et autophagie

Crawford et collègues ont montré que l'infection par le rotavirus induit l'autophagie. La protéine virale NSP4, qui agit comme une viroporine, induit le relargage du Ca^{2+} du RE vers le cytoplasme, ce qui active la CaMKK β , qui active ensuite AMPK et induit l'autophagie (Crawford et al., 2012). La fusion des autophagosomes avec les lysosomes est bloquée selon un mécanisme inconnu. Les autophagosomes auraient probablement comme rôle de délivrer NSP4 et VP7, deux protéines transmembranaires du RE, vers les viroplasmes, le site d'assemblage précoce des particules virales (Berkova et al., 2006; Crawford et al., 2012).

Une autre étude a suggéré que l'infection par le rotavirus induit une lipidation de LC3 qui ne dépend pas de l'autophagie (Arnoldi et al., 2014). Cette lipidation de LC3, et non l'autophagie proprement dite, est nécessaire à la morphogénèse virale.

Le rôle de l'autophagie dans la morphogénèse du rotavirus, qui reste pour l'instant en débat, sera abordé dans la deuxième partie de mes travaux de thèse, en utilisant le modèle cellulaire Caco-2 proche de la cible naturelle du rotavirus (voir le chapitre II de la section Résultats p100).

Le rotavirus est l'agent étiologique majeur responsable de gastro-entérites aiguës virales infantiles à travers le monde. Dans l'étude de sa morphogénèse, notamment des étapes tardives, le modèle de cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2 s'avère le plus judicieux car il se rapproche de la cible naturelle du rotavirus. La morphogénèse du rotavirus présente plusieurs caractéristiques atypiques : (i) c'est un virus non enveloppé, mais une étape clef de son assemblage se déroule dans le RE ; (ii) les virions doivent très probablement ressortir du RE pour compléter leur assemblage; (iii) les virions sortent de manière polarisée au niveau du pôle apical des cellules Caco-2, en empruntant une voie de trafic non conventionnelle qui ne passe pas par l'appareil de Golgi. Cela soulève des questions fondamentales non seulement pour la morphogénèse du rotavirus, mais aussi plus largement en biologie cellulaire, en particulier en ce qui concerne : les voies de sortie du RE qui n'empruntent pas la voie classique dirigée vers l'appareil de Golgi ; et les voies de trafic non conventionnelles et polarisées qui ne passent pas par l'appareil de Golgi.

OBJECTIFS ET STRATEGIES DU TRAVAIL

De nombreux travaux visant à comprendre l'assemblage du rotavirus dans le RE ont (i) caractérisé les interactions entre les protéines virales et la machinerie de repliement et de contrôle qualité des protéines dans le RE et (ii) démontré l'importance de l'exécution correcte de cette fonction du RE dans la morphogénèse virale. Par ailleurs, quelques travaux récents ont mis en évidence l'induction et la modulation de l'UPR par le rotavirus. En remodelant les fonctions du RE, l'UPR pourrait impacter directement l'assemblage viral. Notamment, les mécanismes de dégradation des protéines du RE, renforcés par l'UPR, pourraient être impliqués dans la sortie des particules virales de ce compartiment. Cependant, le rôle fonctionnel de l'UPR dans la morphogénèse du rotavirus n'avait jusque-là pas été exploité, et constitue donc un des objectifs de mon travail. Ce volet de ma thèse s'est principalement concentré sur l'utilisation d'un panel d'inhibiteurs pharmacologiques ou d'outils génétiques afin de moduler spécifiquement chacune des voies de l'UPR et en mesurer l'impact sur la production virale.

Le deuxième objectif de mon travail a été de déterminer si l'autophagie pourrait constituer un mécanisme de sécrétion non conventionnelle qui assure le trafic des particules virales vers le pôle apical des entérocytes sans passer par l'appareil de Golgi. Cet objectif s'installe dans un contexte de résultats contradictoires de la littérature concernant à la fois la caractérisation de l'autophagie dans les cellules infectées et le rôle de ce processus dans le cycle viral. Il est à noter que les cellules MA104 utilisé dans les études précédentes sont lysées par le rotavirus et de ce fait ne sont pas un modèle cellulaire pertinent pour aborder la question de trafic intracellulaire atypique. Pour ces raisons, mon travail a réinitié la caractérisation de l'autophagie au cours de l'infection à rotavirus dans les cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2.

RESULTATS

Chapitre I :

L'activation sélective de l'UPR par les complexes viraux est requise pour la morphogénèse du rotavirus

1. Résumé des résultats

Des travaux récents initiés au laboratoire ont isolé des intermédiaires d'assemblage du rotavirus à des stades de sa morphogénèse se situant à proximité ou dans le RE (bourgeonnement dans le RE, assemblage intra-réticulaire et sortie du RE). Il a également été démontré que les chaperonnes BiP, CNX, CRT et PDI étaient associées aux complexes viraux. Avant ces travaux, l'interaction du rotavirus avec la machinerie de repliement et de contrôle qualité des protéines dans le RE n'avait été étudiée que pour les deux protéines virales NSP4 et VP7, synthétisées dans ce compartiment. Les nouveaux résultats du laboratoire ont ainsi fourni la preuve directe de l'implication de cette machinerie cellulaire dans l'assemblage intra-réticulaire proprement dit du rotavirus. De plus, ces travaux ont suggéré un lien direct entre l'assemblage viral et l'induction de l'UPR dans les cellules infectées.

Dans le premier volet de mon travail de thèse, j'ai développé ces travaux en montrant que :

- L'infection à rotavirus induit le stress du RE et active l'UPR
- L'infection semble moduler de manière différentielle les trois voies de l'UPR car elle induit la réorganisation d'ATF6, mais pas de PERK, dans les viroplasmies
- L'inactivation sélective de chacune des trois voies de l'UPR par des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques ou par des outils génétiques a montré que seules les voies PERK et IRE1 sont requises pour la morphogénèse virale.

L'ensemble de ces résultats a permis d'établir une vue d'ensemble sur la séquence d'événements suivante : assemblage du rotavirus dans le RE - induction de l'UPR - modulation de l'UPR par l'infection - impact fonctionnel de l'UPR sur la réplication du virus, et ont fait l'objet d'un manuscrit soumis pour publication.

Selective Activation of the Unfolded Protein Response by Viral Complexes Is Essential for Efficient Rotavirus Production

Lan-Trang Vu^{1,3†}, Sarah Dib^{1,3†}, Emilie Bessières^{1,3†}, Nathalie Couroussé^{1,3}, Gérard Bolbach^{2,3}, Wilfried Condemine^{1,3}, Sarah Layani^{1,3}, Sarah Duponchel^{1,3}, Eric Chevet⁵, Antoine Garbarg-Chenon^{1,3}, Germain Trugnan^{1,3*}, Serge Chwetzoff^{1,3,4*}

¹ INSERM ERL U1157/UMR7203, équipe 4 “Micro-organismes, biomolécules et physiopathologie intestinale”, Faculté de Médecine Saint Antoine, 27 rue Chaligny, 75012 Paris, France

² CNRS-ENS UMR 7203, équipe 2 “Synthèse, structure et fonction de molécules bioactives”, Plate-forme Spectrométrie de Masse et Protéomique, Université Pierre et Marie Curie, 7-9, Quai Saint-bernard 75005 Paris, France

³ Université Pierre et Marie Curie, UMR7203, 4 place Jussieu 75005 Paris

⁴ INRA, département Santé Animale, Laboratoire de Virologie et Immunologie Moléculaires (VIM), 78350 Jouy en Josas, France.

⁵ INSERM, UMR1053, Team « Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer », Université Bordeaux Segalen, Bordeaux, France.

† These authors contributed equally to the work

* Corresponding authors, to whom reprint request should be addressed

Short Title: rotavirus elicits a selective unfolded protein response

ABSTRACT (218 words)

As many viruses, rotavirus hijacks the host's endoplasmic reticulum (ER) molecular machineries to achieve major steps of its morphogenesis, thereby inducing ER stress. To restore ER homeostasis, target cells elicit the unfolded protein response (UPR) leading to protein translation attenuation, as well as increased protein folding and clearance capacities. However, the molecular mechanisms by which rotavirus triggers ER stress and UPR remain unclear and whether these processes participate to host cell defense or represent a strategy to optimize virus morphogenesis is currently a challenging question. Here, we have isolated rotavirus assembly intermediates that form in cytosolic viral factories (viroplasms) and then enter the ER. We have developed a proteomic analysis of the cellular proteins that specifically associate with these viral complexes. We demonstrate that these viral complexes, rather than individual proteins, recruit cytosolic and ER-resident chaperones, including BiP/GRP78, thus providing a molecular link between rotavirus budding within the ER and initiation of ER stress. Using pharmacological and genetic tools to interfere with UPR signaling, we show here that, even if the three arms of UPR are activated upon rotavirus infection, only PERK and IRE1 are strictly required for efficient rotavirus production. Our results thus define the molecular mechanisms involved in rotavirus-induced UPR initiation and support the idea that viruses may specifically hijack UPR signaling to achieve their morphogenesis.

AUTHOR SUMMARY (184 words)

Proteins must acquire a native conformation essential for their function. To this end, eukaryotic cells have developed folding machineries comprising several specialized proteins named chaperones. The endoplasmic reticulum contains specific folding machineries dedicated to secretory and transmembrane proteins that are connected with quality control and degradation systems to detect and eliminate unfolded proteins. Viruses have evolved strategies to hijack these machineries to their own benefits to efficiently fold and assemble viral proteins and to avoid destruction. Increased protein misfolding burden caused by virus entry in the ER leads to induction of the unfolded protein response (UPR) to restore ER homeostasis. Rotavirus enters the ER during its morphogenesis to fold and acquire its infectious capability. We demonstrate here that rotavirus assembly intermediates interact

with the folding machineries by recruiting chaperones, thus inducing an UPR that in turn is required to achieve complete rotavirus assembly. Interestingly, this virus modulates UPR in a specific way, as shown by the use of pharmacological drugs that are able to interfere with precise targets of UPR. Whether these discoveries may be used as non-vaccinal therapeutic approach remains to be explored.

INTRODUCTION

Many viruses target the endoplasmic reticulum (ER) of their host cells to replicate and/or synthesize a subset of viral proteins [1]. In doing so, viruses interact with several cellular components, including cellular chaperones, thus hijacking the cellular folding machinery to its own benefit [2]. In the ER, the competition between viral and host proteins for folding leads to the accumulation of improperly folded proteins and disruption of ER homeostasis, a situation called ER stress. To restore ER homeostasis the host cells trigger an adaptive pathway named the Unfolded Protein Response (UPR) [3], thanks to three ER stress sensors: inositol-requiring enzyme (IRE1), PKR-like ER kinase (PERK) and activating transcription factor 6 (ATF6) [4]. Activation of the UPR results in global translation attenuation as well as increased expression of proteins involved in ER protein folding (e.g. chaperones) and proteins involved in ER-associated degradation (ERAD) [2], thereby reducing the misfolding burden in the ER. In addition, depending on the cell and virus types, the UPR arms may be activated in a coordinated fashion as for example for the Dengue virus [5] and Sindbis virus [6] or may be induced in more selective ways, as shown for Chikungunya [6] and West Nile viruses [7].

Rotavirus, the major etiological agent responsible for viral gastroenteritis in children and young animals [8,9], is a non-enveloped virus with a three-layered capsid made of 6 structural proteins, namely VP4 (the spike protein) and VP7 for the external layer, VP6 for the intermediate layer and VP2 (plus VP1 and VP3) for the internal layer. This virus exploits the ER for its morphogenesis, since double-layered particles (DLP) containing viral RNAs, VP1, VP2, VP3 and VP6, assembled in cytosolic viral factories (viroplasms), enter the ER and require ER membranes for the biosynthesis and insertion of the structural (VP) glycoprotein VP7 and the spike protein VP4 to achieve the formation of infectious neo-virions [10, 11]. Recent studies have revealed that rotavirus infection elicits an ER stress through the activation of the IRE1 and ATF6 branches of the UPR [12]. In contrast, the phosphorylation of

eIF2 α elicited upon rotavirus infection is driven by PKR rather than PERK [13]. Previous studies also showed that rotavirus proteins interact with either ER-associated or cytosolic chaperones and that the expression of these proteins is up regulated in infected cells [14-18]. However, these studies did not explore the precise mechanisms by which rotavirus may elicit the UPR and whether this adaptive response represents a host defense mechanism or a strategy for the virus to replicate.

In the present work, we characterized the mechanisms by which rotavirus components interact with the cellular machinery to trigger the UPR and studied the functional consequences of UPR activation. Using sub-cellular fractionation and proteomics approaches, we found that Bip/GRP78 interacts with rotavirus particles during the process of assembling and we showed that the three UPR branches are rapidly activated upon infection. Then using both pharmacological and genetic targeting of the UPR [19], we demonstrated that despite the global activation of the UPR, only PERK and IRE1 are required for production of infectious particles, whereas ATF6 is dispensable. These results indicate that viral macromolecular complexes, rather than individual viral proteins, are responsible for ER stress induction and that virus-mediated specific activation of select UPR branches is essential for the completion of the viral cycle.

RESULTS

Isolation of virus-derived VP6-containing macromolecular complex in MA104 infected cells

Experiments were first design to identify the cellular proteins that interact with VP6-containing virus-derived macromolecular complexes. Rotavirus-infected MA-104 cells were lysed at 6 hours post infection. The cytoplasmic fraction was subjected to velocity sedimentation at 110,000x g for 2 h through a 15 – 50 % sucrose gradient. Gradient fractions were analyzed for their protein content using Western blot (WB) with anti-rotavirus VP2, VP4, VP6, VP7, NSP5 and NSP2 antibodies ([Figure 1A](#)). Negative strand RNAs encoding VP2 and VP6 were also detected using RT-PCR in these fractions ([Figure 1B](#)), indicating that the isolated complexes likely derived from double-layered rotavirus-assembling particles (DLPs). Since the above procedure could also lead to the isolation of polysomes, gradient fractions were analyzed using anti-ribosomal S6 protein that clearly indicated that polysomes were indeed present in several fractions ([Figure 1C](#)).

Gradient fractions were then resolved using blue native-PAGE (BN-PAGE), a native PAGE technique allowing isolation of protein complexes under mild conditions. Three major groups of complexes (heavy, H; intermediate, I; light, L) were visualized using WB with an anti-rotavirus antiserum ([Figure 1D](#)). Fractions 1-3 (corresponding to densities ranging from 1.044 to 1.093 g/ml) that contained protein complexes, structural and non-structural rotavirus proteins, VP2 and VP6 RNAs as well as up to 53% of the cellular cytoplasmic proteins, were pooled and further resolved on a 15-30 % sucrose density equilibrium gradient centrifugation at 110,000 x g for 18 h. This second gradient was analyzed as above. As shown in [Figure 1G](#), polysomes-containing fractions were concentrated at the bottom of the gradient. The results presented in [Figure 1](#) indicate that fractions 2 to 6 of the 15%-30% sucrose density gradient, corresponding to densities ranging from 1.068 to 1.084 g/ml, contained 65% of loaded proteins (i.e. 34% of the total initial proteins), no polysomes, VP2 and VP6 RNAs, protein complexes and most of the viral proteins tested. The combination of these criteria indicated that these fractions contained virus-derived VP6-containing macromolecular complexes.

These fractions were pooled, dialyzed and subjected to immuno-affinity purification using anti-rotavirus VP6 monoclonal antibody. Immuno-affinity purified fractions were then analyzed using Western blot following SDS-PAGE ([Figure 2A](#)). Denatured complexes were probed with anti-rotavirus proteins monoclonal antibodies and indicated that VP2, VP6, VP7, NSP5 were predominately present in the immunopurified complexes. Immunoaffinity purified fractions were also analyzed using Western blot following BN-PAGE ([Figure 2B](#)). The analysis of native complexes revealed that the VP6-containing macromolecular complexes were specifically eluted from the affinity column and that several complex species were present in the fractions. These complexes likely correspond to various stages of rotavirus maturation, from DLP formation in viroplasms to DLP maturing in the ER. They were further analyzed using proteomics.

MS identification of cellular proteins associated with virus-derived VP6-containing complexes

2D-BN/SDS-PAGE was performed to separate the proteins contained in the immunopurified VP6-containing protein complexes. Colloidal Coomassie blue G-250 staining of the 2nd dimension gel revealed more than 30 protein spots that were extracted from the gel for mass spectrometry identification. To this end, peptide mass fingerprinting using

MALDI-TOF was complemented by peptide fragmentation using tandem mass spectrometry (MALDI-TOF-TOF). Twelve spots corresponding to one or more cellular proteins were identified ([Figure 3 and Table 1](#)), together with VP6, VP7 and NSP2. Data analysis led to the identification of four groups of cellular proteins ([Figure 4](#)) including a large group of actin interacting proteins, as rotaviruses interact with actin filaments [20, 21] and three other groups, that were all related to chaperone activities: cytosolic chaperones, ER-associated chaperones and a group of Hsp-interacting proteins mostly related to co-chaperoning activities. Interestingly Hsp90 proteins were recovered from H complexes, Hsp70/Hsc70 were found in both H and I complexes, BiP/Grp78 in I complexes and protein disulfide isomerase (PDI)/Calreticulin in L complexes ([Table 1](#)), suggesting that these three types of complexes could correspond to different maturation levels of the viral complexes.

“In vivo” interactions of cytosolic and ER-associated chaperones with virus-derived VP6-containing complexes

To confirm that chaperone proteins interact with viral complexes in living cells, immunofluorescence and co-immunoprecipitation experiments were performed. As shown in [Figure 5](#), dsRNA colocalized with rotavirus structural proteins, labeled with RF138 or RF925 antibodies, as well as with BiP/GRP78, protein disulfide isomerase (PDI) and calnexin (CANX), thus confirming the proteomics analysis. The cellular distribution of BiP/GRP78 was clearly modified in rotavirus-infected cells (compare [Figure 5A](#) to [Figure 5B](#) and [Figure 6](#)). BiP/GRP78 was found both around structures resembling viroplasms and inside the ER ([Figure 6A](#), [boxes 1 and 2](#)). PDI and CANX also redistributed from perinuclear structures in control cells to peripheral punctate structures in infected cells ([Figures 5B and 5C](#)). VP6 colocalized with CANX ([Figures 6A and 6B](#)) and, interestingly, several VP6-labeled dots colocalized with BiP/GRP78 ([Figures 6B](#)). VP2 strongly colocalized with PDI and BiP/GRP78 ([Figure 6C](#)). Additional experiments showed that, upon infection, the three other chaperones studied here (Hsp70, Hsp90 and Calreticulin) relocated from diffuse to punctate distribution (see supplementary figures S1-S3). Interestingly, a large proportion of these punctate structures colocalized with virus structural proteins, mostly VP6 [22]. Remarkably, the observed staining recalled that observed for viroplasms and followed a similar kinetic as a function of the post-infection time [23, 24]. Co-immunoprecipitation experiments showed that VP6 was in complexes with Hsp70, Hsp90, PDI, Calreticulin and BiP/GRP78 in MA-104

cells at 6 h post-infection (Figure 7A). In the reverse experiments, VP6 and VP2 were always coimmunoprecipitated with Hsp70, Hsp90, Calreticulin, and PDI (Figure 7B). Interestingly, immature glycosylated forms of VP7 [22] strongly co-immunoprecipitated with Hsp70 and Hsp90, whereas mature forms were much less present. Our results also indicated that all forms of VP7 co-immunoprecipitated with PDI, whereas only faintly with Calreticulin. These results indicate that chaperones were specifically recruited in the vicinity of virus-derived complexes containing both rotavirus structural proteins and dsRNA around and within the ER. In such model virus-derived VP6-containing molecular complexes might recruit cytosolic as well as ER chaperones during the successive steps of rotavirus morphogenesis, and consequently affect protein homeostasis in those compartments.

Rotavirus infection triggers ER stress and UPR

Since the UPR is activated upon rotavirus infection [12,25], and as we demonstrated that rotavirus-derived complexes recruited components of the ER folding machinery, we sought to investigate ER stress in our experimental system. *XBP1* mRNA splicing was rapidly detected in infected cells using RT-PCR (Figure 8A), thus indicating that the RF strain of rotavirus activates the IRE1 pathway, as already shown for RRV and OSU strains [12], [25]. ATF6 activation upon rotavirus infection was detected using EGFP-ATF6 transfected Cos7 cells (Figure 8B). The percentage of EGFP-ATF6 nuclear localization events in infected and mock infected cells was 29 ± 4 % and 6 ± 1 % respectively, indicating that RF rotavirus also activated the ATF6 pathway. We were unable to detect changes in PERK phosphorylation, due to very low amounts in infected MA104 cells. Together these results are in agreement with previous data obtained, using different methods with other rotavirus strains. They suggest that the UPR is activated upon rotavirus infection.

Rotavirus promotes the formation of complexes containing ER-associated chaperones, dsRNA, rotavirus capsid proteins and UPR sensors.

We then studied the effects of rotavirus infection on the cellular distribution of ER stress sensors. MA104 cells were mock infected or infected for 6h, stained and analyzed by confocal microscopy. In Mock infected cells, ATF6 and PERK were, as expected, distributed within the ER but did not colocalize with CANX, an ER-resident membrane protein known to be associated with the ER-associated folding (ERAF) sub-compartment (Figure 9A-B) [26,27]. Upon rotavirus infection, a significant part of ATF6 was efficiently redistributed to large

puncta where CANX also localized. Interestingly these puncta were also stained with antibodies recognizing dsRNA and viral proteins, namely VP2 and VP6 and some of them clearly resemble viroplasms ([Figure 9C](#)). These results indicated that the entry of viral complexes within the ER was able to reorganize ATF6 as shown above for CANX. PERK displayed a different pattern, since, upon infection, PERK was redistributed to a perinuclear compartment, likely corresponding to the ER Quality Control (ERQC) compartment and was almost not found in viroplasms, although PERK was partly colocalized with CANX and with complexes containing dsRNA and viral proteins ([Figure 9D](#)). Thus, these results indicate that ER stress sensors redistribute distinctly upon infection and suggest that relationships exist between UPR components, viral complexes and CANX.

The UPR is required for efficient rotavirus production

To test whether the UPR represents a mechanism of cell response to infection or is exploited by the virus for its morphogenesis, we used inhibitors that are selective of each branch of the UPR [19]. MA104 cells were firstly infected by rotavirus, secondly treated with inhibitors, and then rotavirus production yields measured using plaque assays. All these drugs were not toxic in the range of concentrations used. As a positive control, rotavirus production was measured in untreated cells. As a negative control, cells were treated with cycloheximide to block any protein translation ([Figure 10A](#)). The critical role of the endoplasmic reticulum chaperone BiP/GRP78 has been investigated by using honokiol, a small molecule derived from *Magnolia grandiflora*, and known to directly bind to BiP/GRP78 with a high specificity and a high efficiency, resulting in the inhibition of its chaperone capacities [28], thus impairing proper protein folding. Honokiol (25 μ M) almost completely suppressed rotavirus production, indicating that BiP/GRP78 must be functional for an efficient rotavirus morphogenesis. Since PERK exerts its translational attenuation activity through eIF2 α phosphorylation, we first used compound 38 (GSK2606414) [29], recently discovered as a potent (IC₅₀: 0.4 nM) and highly selective competitive inhibitor of PERK kinase activity. GSK2606414 treatment (20 μ M) resulted in a 95% inhibition of rotavirus production ([Figure 10A](#)), indicating that eIF2 α phosphorylation (i.e. global cellular translation attenuation) might be required for efficient rotavirus production. To confirm this, we also used two additional drugs known to prevent eIF2 α dephosphorylation by PP1c-GADD34, Salubrinal [30] and Guanabenz [31]. Interestingly, treatment with either Salubrinal (used at

20 μ M) or Guanabenz (20 μ M) resulted in strong inhibition of rotavirus production (Figure 10A). The role of IRE1 in rotavirus production was also investigated using first the IRE1 Inhibitor 4 μ 8C [32]. Treatment of MA104 cells with 20 μ M 4 μ 8C resulted in 85% decrease of rotavirus production. A second pharmacological inhibitor of the RNase activity of IRE1 was used to confirm these results. Toyocamycin, produced by an *Actinomyces* strain, specifically blocks IRE1-mediated XBP1 mRNA splicing [33]. Toyocamycin, used at 50 μ M, provoked a 75% reduction of rotavirus production (Figure 10A). Interestingly, treatment of cells with both 4 μ C8 and salubrinal, thus inhibiting both IRE1 pathway and eIF2 α dephosphorylation, resulted in an even stronger inhibition of rotavirus production, meaning that the contribution of these two UPR pathways has additional effects. Using 16F16, an inhibitor of PDI recently shown to block ATF6 activation [34], we observed that rotavirus production was unaffected (Figure 10A), suggesting that this UPR arm may not be functionally involved in rotavirus production. To confirm this result we used shRNAs directed against ATF6 and showed that cells expressing these shRNA did not display any decrease of rotavirus production (Figure 10B).

DISCUSSION

Several viruses have evolved a large array of strategies to control the UPR. Whether UPR is beneficial or detrimental for virus production should depend on the nature of interactions between viral and cellular components. It is therefore important to consider that the UPR modulates central mechanisms in cell protein and membrane homeostasis at the ER level, namely ERAF, ERQC and ERAD compartments that share the complex network of molecular cytosolic and ER-associated chaperones [26,27,35-37]. Most of the eukaryotic viruses studied so far control these interconnected processes to achieve their replication. Hence, it is required to analyze virus-host cell interactions at the molecular level to more precisely understand how viruses cope with the cellular machineries to ensure their replication in an optimized environment.

The present work aims at understanding the relationships between rotavirus infection and UPR induction to ensure its efficient production. Herein we show that viral complexes interact with cellular molecular chaperones and co-chaperones, including BiP/GRP78, thus providing a potential molecular link between rotavirus infection and UPR

management. Then, using select pharmacological inhibitors [19] we demonstrate that only the PERK and IRE1 arms of the UPR are strictly required for efficient rotavirus production.

Rotavirus, as several other virus families, including *Poxviridae*, *Coronaviridae*, *Herpesviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae* and *Bunyaviridae* [38,39], rapidly induces the formation of viral factories which are located very close to the ER and are the site where VP1, VP2, VP3 and VP6 viral structural proteins and viral RNA assemble, with a major contribution of NSP5 and NSP2, before entering the ER [23,24]. Former studies have characterized rotavirus intermediates allowing a complete description of their content in viral proteins [40-42]. However, the cellular proteins associated with these intermediates remained to be described. Using proteomics, we characterized rotavirus-derived VP6-containing complexes formed at six hours post infection in MA-104 cells, a time at which rotavirus DLPs are thought to actively bud from viroplasms into the ER compartment (reviewed by Trask et al. [43]). All the complexes studied here contained structural and non-structural viral proteins and harbored VP2 and VP6 negative strands RNA, thereby indicating that they effectively derived from replicating rotavirus intermediates. Importantly, immunopurified complexes appeared as non-homogeneous in 2D-BN PAGE (Figure 3). Such a relative heterogeneity suggests that we most likely isolated a mix of complexes corresponding to successive steps of virus maturation between viroplasms and ER-associated viral structures. This conclusion was reinforced by immunofluorescence studies in which dsRNA, structural rotavirus proteins and ER-associated as well as cytoplasmic chaperones colocalize in different structures (Figures 5, 6, S1-S3). As such, our results suggest that light complexes might derive from the ER, as they contain most of the ER chaperones, whereas heavy and intermediate complexes might originate from the cytosol, as they are enriched in cytosolic chaperones.

Moreover in this work we show that ER-resident chaperones are recruited by VP6-containing virus-derived complexes and not only by isolated viral proteins, as shown by most of the studies performed previously [15,44-46]. This likely occurs during the budding of DLPs from viroplasms into the ER and within the ER lumen. This appears logical since the large amount of rotavirus components that enters the ER requires massive chaperoning for the subsequent steps of virus morphogenesis, as demonstrated by the fact that honokiol, an inhibitor of BiP/GRP78, completely blocks rotavirus production. The precise mechanisms controlling DLPs entry into the ER remain to be fully described, but our results suggest that

viral complexes exposing VP6 might recruit chaperones to mediate their interactions with ER proteins, including ER stress sensors, as shown in [Figure 9](#). We propose that this step is required for correct folding and prevention of aggregation of ER-associated viral glycosylated and non-glycosylated proteins, known to use different folding strategies [47,48]. Accordingly, we hypothesized that interactions of viral complexes with ER-resident chaperones and with ER stress sensors could selectively control the UPR to ensure rotavirus maturation. We also found in our study that cytosolic chaperones interacted with a subset of viral complexes, as suggested by previous works [17,18,49]. Our biochemical and immunofluorescence experiments indicate that both Hsp70 and Hsp90 proteins are not only expressed in infected cells as isolated proteins but are also incorporated to virus-associated macromolecular complexes, strongly suggesting that cytosolic chaperones may ensure steps of rotavirus morphogenesis.

Two findings from our work provide a molecular link between the entry of rotavirus components into the ER and the onset of an ER stress-induced UPR: (i) BiP/GRP78 interacts with virus-derived VP6-containing complexes and (ii) ER stress sensors interact with viral complexes and CANX. This suggests that, through their interactions with BiP/GRP78, viral complexes may act by releasing this chaperone from the ER luminal domain of the three proximal ER stress sensors, as previously shown for numerous individual proteins [50], and promotes activation of PERK, IRE1, and ATF6. Moreover, we show here that using 4 μ 8C or toyocamycin to block XBP1 mRNA splicing and/or RIDD [19,32,33,51] resulted in a strong inhibition of rotavirus production. Even though PERK may not be the main kinase responsible for eIF2 α phosphorylation in cells infected with rotavirus [66], the negative effect of GSK2606414, a specific inhibitor of PERK kinase activity [29], on viral production observed in our study indicates that PERK is activated during rotavirus infection and moreover is required for viral morphogenesis. The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2), which has been identified as another PERK effector [67], induces transcription of genes involved in the oxidative response [68] and those encoding proteasome subunits, which are required for efficient ERAD activity [69]. The use of two specific inhibitors of eIF2 α dephosphorylation, namely salubrinal and guanabenz, also resulted in a strong decrease in virus yield, suggesting that protein translation, even if reduced in infected cells by NSP3-induced shutoff [12] or by PKR-induced eIF2 α phosphorylation [66]. Surprisingly, despite the clear activation of ATF6, our results indicated that inhibition of ATF6 activation either using

16F16 or shRNAs did not result in decreased rotavirus production. This may be explained by the fact that despite virus-mediated ATF6 activation, i.e. the induction of its trafficking to the Golgi, a significant part of ATF6 remained clustered within viroplasms and thus did not play its transcription factor role.

In conclusion, our results (i) indicate that rotavirus activates UPR, (ii) suggest a mechanism for UPR induction supported by the recruitment of cellular chaperones by virus-derived VP6-containing molecular complexes and (iii) demonstrate that the PERK and IRE1 branches of UPR are required for efficient virus production.

MATERIALS AND METHODS

Cells, virus and antibodies. MA-104 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (PAA Laboratories, Austria) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, UK), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml of streptomycin at 37°C with 5% CO₂. Production and titration of the bovine rotavirus RF strain were carried out as previously described [55]. Infections of cells were performed at a MOI of 10 PFU per cell, except when otherwise stated. In mock experiments, cells were treated exactly as for infection, except that no virus was added to cells. Antibodies used in these experiments were: anti-Calreticulin mouse mAb (SPA601, Stressgen, USA), anti-Hsp90 mouse mAb (SPA830, Stressgen), anti-Hsp70 mouse mAb (SPA 810, Stressgen), anti-PDI mouse mAb (SPA 891, Stressgen), anti-ribosomal protein S6 rabbit Ab (Ab-235 Signalway Antibody, USA), anti-GRP78 rabbit Ab (EPR4041(2)) (Novus Biologicals, Cambridge Science Park, Cambridge, United Kingdom), anti-calnexin rabbit polyclonal antibodies (C-20) (Santa Cruz Biotechnology), anti-dsRNA mouse mAb (J2) (Scicons, Budapest, Hungary), PERK Rabbit mAb (D11A8) (Cell Signaling Technology, Ozyme Saint Quentin Yvelines France), anti ATF6 rabbit polyclonal antibodies (H-280) (Santa Cruz Biotechnology), anti-mouse Alexa Fluor 488 conjugated Ab (Molecular Probes, USA), anti-rabbit FITC conjugated Ab (Jackson ImmunoResearch lab., USA), anti-mouse Cy3 conjugated Ab (Jackson ImmunoResearch lab.), anti-rabbit Cy3 conjugated Ab (Jackson ImmunoResearch lab.), anti-goat Alexa Fluor 647 (Life Technologies), anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated Ab (A9169, Sigma-Aldrich, USA), anti-mouse horseradish peroxidase conjugated IgG (Sigma-Aldrich), M60 mouse anti-rotavirus VP7 mAb [56], RV138 mouse anti-rotavirus VP6 mAb [57], 7.7 and 2G4 mouse anti-rotavirus VP4 mAb [58], 164E22 mouse anti-rotavirus VP2 mAb [59], 158G37 mouse anti-rotavirus NSP5 mAb [60], LA5 mouse anti-rotavirus NSP2

mAb [61], 8148F anti-rotavirus RF rabbit polyclonal Ab a gift from Dr Jean Cohen, Gif sur Yvette, France), RF 925 anti-rotavirus goat polyclonal antibody and RF138 anti-rotavirus goat polyclonal antibody (gifts of René L'Haridon, INRA Jouy en Josas, France).

Purification of viral complexes from MA-104 cells. Lysis of infected MA-104 cells were performed in 10 mM Hepes pH 7.4, 110 mM CH₃COOK, 300mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT and proteases inhibitors (Complete Mini protease inhibitor EDTA free, Roche Diagnostics, Germany) by three freeze/thawing cycles in liquid nitrogen, then by 10 up-and-down strokes in a Dounce homogenizer. Lysed cells were centrifuged at 800 x g for 15 min at 4°C. The resulting supernatants (S800) were further centrifuged at 6,000 x g for 15 min at 4°C (S6000). S6000 were overlaid on 15-50% sucrose gradients and centrifuged at 110,000 x g for 2 hours at 4°C in a SW41Ti rotor (Beckman, Fullerton, USA). Gradient fractions in a density range from 1.044 to 1.093 g/mL, i.e. fractions 1-3 of Fig 1A, were pooled and overlaid on 15-30% sucrose gradients, then centrifuged at 110,000 x g for 18 hours at 4°C in a SW41Ti rotor. Fractions with density ranging from 1.068 to 1.084 g/mL, i.e. fraction 2-6 of Fig 1E, were pooled, extensively dialyzed against 10 mM Tris-HCl pH8.0 and 2 mM MgCl₂, then incubated with Sepharose-Protein G (Sepharose Protein G 4 Fast Flow, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) DMP-conjugated (Dimethyl pimelimidate-2HCl, Pierce Biotechnology, Perbio, Rockford, USA) to RV138 anti-VP6 mAb monoclonal antibody during 18 hours at 4°C. The Sepharose beads were then washed with 10mL of 10 mM Tris-HCl pH8.0, 0.5% Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich) and retained proteins were eluted with 4 x 1.5 ml of 0.2 M citrate pH3.0.

2D-Blue Native-PAGE. Immuno-purified fractions were pooled, concentrated (AMICON ultra-4, Millipore, USA) and resuspended in 45 mM Tris (hydroxymethyl) aminoethane pH 7.8, 80 mM boric acid, 0.4 M aminohexanoic acid/HCl (TBA buffer) containing 5% (w/v) Coomassie brilliant blue G-250 (Sigma-Aldrich, France). Samples were centrifuged at 10,000xg for 5 min then loaded onto Blue native polyacrylamide gels (BN-PAGE) as previously described [62] Pappin:1993uo}. Briefly, 5-12% acrylamide gradient gels were cast and overlaid with 4% acrylamide in TBA buffer. Electrophoresis took place at constant voltage of 15 V/cm for 3 hours. The anode buffer contained 45 mM 2-Amino-2-(hydroxymethyl) propane-1,3-diol, 80 mM boric acid, pH 7.8 and the cathode buffer contained 45 mM 2-Amino-2-(hydroxyméthyl) propane-1,3-diol, 80 mM boric acid pH 7.8. Coomassie brilliant blue G-250 (0.067%, w/v) was used throughout the run. Strips of first dimension gels were denatured by treatment

with 100 mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 62 mM Tris-HCl pH 6.8, at 50°C for 30 min. Second orthogonal dimension SDS-PAGE electrophoresis were carried out according to standard Laemmli conditions. Gels were run at 8 V/cm during stacking, then at 15 V/cm during resolving gels. 2-D gels were fixed in 50% ethanol - 2.35% Phosphoric acid and then stained with 0.1% w/v Coomassie brilliant blue G-250 in 2% Phosphoric acid, 17% ethanol, 15% ammonium sulfate.

Western blot analysis. Once proteins were transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Sweden), the membranes were saturated with 1% Polyvinyl-pyrrolidone in Dulbecco's PBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} (PAA Laboratories, Austria) containing 0.5% Tween 20 for 1 hour at room temperature, then incubated with primary antibodies in PBS containing 0.5% Tween 20 for 1 hour at room temperature. The membranes were washed with PBS containing 0.5% Tween 20 and incubated with peroxidase-labeled antibodies in PBS containing 0.5% Tween20 for 1 hour at room temperature. The membranes were then washed with PBS containing 0.5% Tween 20, visualized using ECL and exposure to ECL Hyperfilms (GE Healthcare, Sweden).

Identification of protein spots by MS/MS. Following destaining and extensive rinsing in H_2O , protein spots were manually excised and characterization of the proteins present in the excised gel fragments was carried out as described in: http://ifr-bi.snv.jussieu.fr/rubrique_3/ServicesCommuns/proteomique/ftp/Digestion_gel.pdf. Briefly, after in-gel tryptic cleavage (Promega, USA), peptides were desalted on Zip Tip C18 (Millipore, USA) then eluted in 5 μl of acetonitrile / 1% formic acid (1/1). The peptides were mixed with the matrix consisting in α -cyano-4 hydroxycinnamic acid in 0.1% trifluoro-acetic acid (Waters, USA) and spotted onto the MALDI sample plate. Analyzes were performed in a Voyager-DE Pro MALDI-TOF (Applied Biosystems, USA) at the Spectrometry Platform (ERL INSERM U1157, Saint Antoine Medicine Faculty, Paris, France) and a 4700 MALDI-TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems) at the "Plateforme de Protéomique et Spectrométrie de Masse", IFR 83, Pierre and Marie Curie University, Paris, France. Mass spectra were analyzed by using Data Explorer software (Applied Biosystems) and data collected were submitted to MASCOT database from SwissProt Expasy. The "Swiss Prot" access numbers allowed us to find the identified proteins in the database. The Molecular Weight Search score (Mowse Score, [63]) was obtained for mass fingerprinting by a statistical calculation, taking into account different parameters such as the precision of the measure of the mass (i.e. the

difference between theoretical mass and experimental mass) and the percentage of recovery of the amino acid sequence. The percentage of recovery corresponds to the percentage of coincidence between the peptides that allowed the Mascot software to recognize the protein and the sequence of the protein identified. Finally, the error was calculated by the Mascot software, based on the difference between the values calculated for theoretical peptides derived from proteins and the experimental values obtained.

Immunofluorescence. Rotavirus infected MA-104 cells were either fixed for 1 min in cold methanol or for 10 min in 2% paraformaldehyde then permeabilized with 0.1% Triton X100 or 0,075% saponin. Immunofluorescence (IF) images were captured with either a Leica SP2 or a Leica SP5 confocal laser (Wetzlar, Germany). The 488 nm and the 543 nm wavelengths of argon ion lasers were used for sequential excitation of Alexa Fluor 488, Cy3 and Alexa Fluor 647. The biphoton beamline (Chameleon, Coherent Inc., USA) was used at 750 nm to record the DAPI signal. Sections, each 0.2 μm thick, were recorded. Merged images were obtained by means of computer overlay of green red and blue images using Leica Confocal Software and mounted using Image J and Photoshop CS4. Displayed are the median sections i.e. section Z3.

Co-immunoprecipitation experiments. MA-104 cells lysates were incubated with RV138 anti-rotavirus VP6 monoclonal antibody conjugated to Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Sweden) and shaken overnight at 4°C. Alternatively, MA-104 cells lysates were incubated with selected antibodies at room temperature for 3 hours, then supplemented with Protein G Sepharose 4 Fast Flow with gentle over-night shaking at 4°C. Antigen-antibody-Protein G-Sepharose complexes were centrifuged at 10,000 x g for 2 min and washed with a phosphate buffered saline pH 7.4 containing 10 mM Na_2HPO_4 , 1,76 mM KH_2PO_4 , 280 mM NaCl and 1mM DTT. Laemmli buffer and heat treatment were used for samples to be analyzed by SDS-PAGE.

Quantitative PCR assays. Total RNA of infected cells was prepared by Trizol/chloroform extraction (Invitrogen, USA) after sucrose gradient fractionations. Reverse transcriptions (RT) were performed using the Thermoscript RT-PCR system according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Rotavirus RF strain specific primers (Eurogentec, Liege, Belgium) were designed: the VP6 forward primer (5' GCCCGTTTAGTAGAACTCT 3') and the VP6 reverse primer (5' GCGCCAGCTAATACGCAA 3') amplified a 202 bp fragment. The VP2 forward primer (5' CAACTTTACCGGCATCTCTC 3') and the VP2 reverse primer (5'

CCGAGACAGCTACCAATTTAT 3') amplified a 227 bp fragment. The *Maccaca mulatta* GAPDH forward primer (5' GGGTGGAAATCATACTGGAA 3') and GAPDH reverse primer (5' GGTCGGAGTCAACGGATT 3') amplified a 143 bp fragment. Real-time qPCR was performed in 25 µl final volume, using an ABI 7000 Sequence Detection System apparatus with system software version 1.1 (Applied-Biosystems) and Power Subr Green PCR Master Mix (Applied-Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Samples of two independent experiments and serial dilutions of cDNA templates were run in duplicate. Relative quantification was based on the GAPDH reference gene and the instrument determined the cycle threshold (CT) automatically.

Detection of XBP1 mRNA splicing by RT-PCR. The splicing of human XBP1 has been detected by standard RT-PCR using total RNA templates isolated from MA-104 cells. Common methods and materials were used for total RNA purification and RT-PCR. From total RNA, first-strand cDNA was synthesized by using the Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). To amplify XBP1 mRNA, PCR was for 30 cycles: 94 °C for 30 s; 58 °C for 30 s; and 72 °C for 1 min using 5'- TTACGAGAGAAAACATGGCC-3' (XBP1 forward) and 5'- GGGTCCAAGTTGTCCAGAATGC-3' (XBP1 reverse) with Taq DNA Polymerase. The amplified PCR fragments were separated by electrophoresis on 4% agarose gels and visualized by GelRed staining (Thermo scientific).

ATF6 translocation assay. COS-7 cells were grown in InVirus culture medium (Gravesano, Switzerland) at 37°C in the presence of 5% CO₂ on 22 x 22 mm glass slides in 962 mm² wells. Cells were transfected with the pCMVshort-EGFP-ATF6α plasmid [64] by using the TransIT-COS Transfection Kit (Mirus Bio, Madison, WI). 4 µg of plasmid were added to 250 µl of DMEM containing 12 µl of TransIT-COS Reagent and 4 µl of COS BossReagent. This mixture was incubated 30 minutes at room temperature and added to wells containing 500,000 COS-7 cells in 1 ml of culture medium. 13 hours after the start of transfection, the cell medium was replaced with DMEM. Rotavirus was treated with trypsin for 30 minutes as previously described, then brought into contact for 30 minutes with the cells, due to an MOI of 10. After 7 hours of infection, cells were analyzed. Control cells were treated following the same protocol but received neither plasmid nor virus, and were then treated or not with 1 mM DTT or 5 mM DTT for 90 minutes prior to analysis.

Inhibition of UPR pathways and virus yield measurements. MA-104 cells were infected for 16 hours with RF strain rotavirus and treated or not with chemicals starting at 1-hour post

infection. Chemicals used were GSK2606414 (Merck Millipore), Salubrinal (Enzo Life Sciences), 4 μ 8C (Calbiochem), Toyocamycin (Sigma-Aldrich), while Guanabenz, Honokiol, cycloheximide and 16F16 were from Sigma-Aldrich. Preliminary toxicity experiments were carried out to define the working concentrations. The infectious titer of viral progenies was determined as plaques on monolayers of MA-104 cells essentially as previously described [65], but using 1,2% methylcellulose in place of agarose overlays. Data are means \pm S.D. from six measures in three independent experiments. * $p < 0.05$.

Effect of ATF6 knockdown on rotavirus production. Knockdown of ATF-6 expression in Caco-2 cells has been reached by use of a lentiviral vector for shRNA expression (The RNAi Consortium, The Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA). Caco-2 cells were transduced with shRNAs directed against ATF6 or negative control scrambled shRNA.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Romain Morichon and Philippe Fontanges for assistance in generating confocal images at the Imaging facilities of Institut Federatif de Recherche IFR 65, CHU Saint Antoine, Faculty of Medicine Pierre and Marie Curie, and Sophie Ancel for technical assistance.

REFERENCES

1. Inoue T, Tsai B (2013) How Viruses Use the Endoplasmic Reticulum for Entry, Replication, and Assembly. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5: a013250. doi:10.1101/cshperspect.a013250.
2. Geiger R, Andritschke D, Friebe S, Herzog F, Luisoni S, et al. (2011) BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Nat Cell Biol* 13: 1305–1314. doi:10.1038/ncb2339.
3. Hetz C (2012) The unfolded protein response:controlling cell fate decisions underER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 89–102. doi:10.1038/nrm3270.
4. Schröder M (2007) Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci* 65: 862–894. doi:10.1007/s00018-007-7383-5.
5. Umareddy I, Pluquet O, Wang Q, Vasudevan SG, Chevet E, et al. (2007) Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virology Journal* 4: 91. doi:10.1186/1743-422X-4-91.
6. Rathore APS, Ng M-L, Vasudevan SG (2013) Differential unfolded protein response during Chikungunya and Sindbis virus infection: CHIKVnsP4 suppresses eIF2 α phosphorylation. *Virology Journal* 10: 1–1. doi:10.1186/1743-422X-10-36.
7. Ambrose RL, Mackenzie JM (2011) West Nile Virus Differentially Modulates the Unfolded Protein Response To Facilitate Replication and Immune Evasion. *J Virol* 85: 2723–2732. doi:10.1128/JVI.02050-10.

8. Lundgren O, Svensson L (2001) Pathogenesis of Rotavirus diarrhea. *Microbes and Infection* 3: 1145–1156.
9. Ramig RF (2004) Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *J Virol* 78: 10213–10220. doi:10.1128/JVI.78.19.10213-10220.2004.
10. Au KS, Chan WK, Burns JW, Estes MK (1989) Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *J Virol* 63: 4553–4562.
11. Kabcenell AK, Poruchynsky MS, Bellamy AR, Greenberg HB, Atkinson PH (1988) Two forms of VP7 are involved in assembly of SA11 rotavirus in endoplasmic reticulum. *J Virol* 62: 2929–2941.
12. Trujillo-Alonso V, Maruri-Avidal L, Arias CF, Lopez S (2011) Rotavirus Infection Induces the Unfolded Protein Response of the Cell and Controls It through the Nonstructural Protein NSP3. *J Virol* 85: 12594–12604. doi:10.1128/JVI.05620-11.
13. Rojas M, Arias CF, Lopez S (2010) Protein Kinase R Is Responsible for the Phosphorylation of eIF2 in Rotavirus Infection. *J Virol* 84: 10457–10466. doi:10.1128/JVI.00625-10.
14. Mirazimi A, Nilsson M, Svensson L (1998) The molecular chaperone calnexin interacts with the NSP4 enterotoxin of rotavirus in vivo and in vitro. *J Virol* 72: 8705–8709.
15. Xu AA, Bellamy ARA, Taylor JAJ (1998) BiP (GRP78) and endoplasmic (GRP94) are induced following rotavirus infection and bind transiently to an endoplasmic reticulum-localized virion component. *J Virol* 72: 9865–9872.
16. Cuadras MA, Feigelstock DA, An S, Greenberg HB (2002) Gene Expression Pattern in Caco-2 Cells following Rotavirus Infection. *J Virol* 76: 4467–4482. doi:10.1128/JVI.76.9.4467-4482.2002.
17. Maruri-Avidal L, Lopez S, Arias CF (2008) Endoplasmic Reticulum Chaperones Are Involved in the Morphogenesis of Rotavirus Infectious Particles. *J Virol* 82: 5368–5380. doi:10.1128/JVI.02751-07.
18. Broquet AH, Lenoir C, Gardet A, Sapin C, Chwetzoff S, et al. (2007) Hsp70 negatively controls rotavirus protein bioavailability in caco-2 cells infected by the rotavirus RF strain. *J Virol* 81: 1297–1304. doi:10.1128/JVI.01336-06.
19. Hetz C, Chevet E, Harding HP (2013) Targeting the unfolded protein response in disease. *Nature Publishing Group* 12: 703–719. doi:10.1038/nrd3976.
20. Gardet A, Breton M, Trugnan G, Chwetzoff S (2007) Role for Actin in the Polarized Release of Rotavirus. *J Virol* 81: 4892–4894. doi:10.1128/JVI.02698-06.
21. Gardet A, Breton M, Fontanges P, Trugnan G, Chwetzoff S (2006) Rotavirus Spike Protein VP4 Binds to and Remodels Actin Bundles of the Epithelial Brush Border into Actin Bodies. *J Virol* 80: 3947–3956. doi:10.1128/JVI.80.8.3947-3956.2006.
22. Nejmeddine M, Trugnan G, Sapin C, Kohli E, Svensson L, et al. (2000) Rotavirus Spike Protein VP4 Is Present at the Plasma Membrane and Is Associated with Microtubules in Infected Cells. *J Virol* 74: 3313–3320. doi:10.1128/JVI.74.7.3313-3320.2000.
23. Contin R, Arnoldi F, Campagna M, Burrone OR (2010) Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. *Journal of General Virology* 91: 1782–1793. doi:10.1099/vir.0.019133-0.
24. Carreño-Torres JJ, Gutiérrez M, Arias CF, Lopez S, Isa P (2010) Characterization of

- viroplasm formation during the early stages of rotavirus infection. *Virology Journal* 7: 350. doi:10.1186/1743-422X-7-350.
25. Zambrano JL, Ettayebi K, Maaty WS, Faunce NR, Bothner B, et al. (2011) Rotavirus infection activates the UPR but modulates its activity. *Virology Journal* 8: 359. doi:10.1186/1743-422X-8-359.
 26. Chevet E, Smirle J, Cameron PH, Thomas DY, Bergeron JJM (2010) Seminars in Cell & Developmental Biology. *Semin Cell Dev Biol* 21: 486–490. doi:10.1016/j.semcd.2009.12.005.
 27. Määttänen P, Gehring K, Bergeron JJM, Thomas DY (2010) Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. *Semin Cell Dev Biol* 21: 500–511. doi:10.1016/j.semcd.2010.03.006.
 28. Martin S, Lamb HK, Brady C, Lefkove B, Bonner MY, et al. (2013) Inducing apoptosis of cancer cells using small-molecule plant compounds that bind to GRP78. *British Journal of Cancer* 109: 433–443. doi:10.1038/bjc.2013.325.
 29. Axten JM, Medina JR, Feng Y, Shu A, Romeril SP, et al. (2012) Discovery of 7-Methyl-5-(1-{[3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl}-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a Potent and Selective First-in-Class Inhibitor of Protein Kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK). *J Med Chem* 55: 7193–7207. doi:10.1021/jm300713s.
 30. Boyce M (2005) A Selective Inhibitor of eIF2 Dephosphorylation Protects Cells from ER Stress. *Science* 307: 935–939. doi:10.1126/science.1101902.
 31. Tsaytler P, Harding HP, Ron D, Bertolotti A (2011) Selective Inhibition of a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 Restores Proteostasis. *Science* 332: 91–94. doi:10.1126/science.1201396.
 32. Cunha DA, Igoillo-Esteve M, Gurzov EN, Germano CM, Naamane N, et al. (2012) Death Protein 5 and p53-Upregulated Modulator of Apoptosis Mediate the Endoplasmic Reticulum Stress–Mitochondrial Dialog Triggering Lipotoxic Rodent and Human β -Cell Apoptosis. *Diabetes* 61: 2763–2775. doi:10.2337/db12-0123/-/DC1.
 33. Ri M, Tashiro E, Oikawa D, Shinjo S, Tokuda M, et al. (2012) Identification of Toyocamycin, an agent cytotoxic for multiple myeloma cells, as a potent inhibitor of ER stress-induced XBP1 mRNA splicing. *2: e79–11*. doi:10.1038/bcj.2012.26.
 34. Higa A, Taouji S, Lhomond S, Jensen D, Fernandez-Zapico ME, et al. (2014) Endoplasmic Reticulum Stress-Activated Transcription Factor ATF6 Requires the Disulfide Isomerase PDIA5 To Modulate Chemoresistance. *Molecular and Cellular Biology* 34: 1839–1849. doi:10.1128/MCB.01484-13.
 35. Leitman J, Ron E, Ogen-Shtern N, Lederkremer GZ (2013) Compartmentalization of Endoplasmic Reticulum Quality Control and ER-Associated Degradation Factors. *DNA and Cell Biology* 32: 2–7. doi:10.1089/dna.2012.1889.
 36. Nagy PD, Wang RY, Pogany J, Hafren A, Makinen K (2011) Emerging picture of host chaperone and cyclophilin roles in RNA virus replication. *Virology* 411: 374–382. doi:10.1016/j.virol.2010.12.061.
 37. Wiseman RL, Powers ET, Buxbaum JN, Kelly JW, Balch WE (2007) An Adaptable Standard for Protein Export from the Endoplasmic Reticulum. *Cell* 131: 809–821. doi:10.1016/j.cell.2007.10.025.
 38. Netherton C, Moffat K, Brooks E, Wileman T (2007) A Guide to Viral Inclusions,

Membrane Rearrangements, Factories, and Viroplasm Produced During Virus Replication. *Advances in Virus Research*. *Advances in Virus Research*. Elsevier, Vol. 70. pp. 101–182. doi:10.1016/S0065-3527(07)70004-0.

39. Netherton CL, Wileman T (2011) Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. *Current Opinion in Virology* 1: 381–387. doi:10.1016/j.coviro.2011.09.008.
40. Gallegos CO, Patton JT (1989) Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* 172: 616–627.
41. Poruchynsky MS, Atkinson PH (1991) Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *J Virol* 65: 4720–4727.
42. Patton JT, Vasquez Del Carpio R, Tortorici MA, Taraporewala ZF (2006) Coupling of Rotavirus Genome Replication and Capsid Assembly. *Advances in Virus Research*. *Advances in Virus Research*. Elsevier, Vol. 69. pp. 167–201. doi:10.1016/S0065-3527(06)69004-0.
43. Trask SD, Ogden KM, Patton JT (2012) Interactions among capsid proteins orchestrate rotavirus particle functions. *Current Opinion in Virology* 2: 373–379. doi:10.1016/j.coviro.2012.04.005.
44. Mirazimi A, Svensson L (2000) ATP Is Required for Correct Folding and Disulfide Bond Formation of Rotavirus VP7. *J Virol* 74: 8048–8052. doi:10.1128/JVI.74.17.8048-8052.2000.
45. Maruri-Avidal L, Lopez S, Arias CF (2008) Endoplasmic Reticulum Chaperones Are Involved in the Morphogenesis of Rotavirus Infectious Particles. *J Virol* 82: 5368–5380. doi:10.1128/JVI.02751-07.
46. Mirazimi A, Nilsson M, Svensson L (1998) The molecular chaperone calnexin interacts with the NSP4 enterotoxin of rotavirus in vivo and in vitro. *J Virol* 72: 8705–8709.
47. Okuda-Shimizu Y, Hendershot LM (2007) Characterization of an ERAD Pathway for Nonglycosylated BiP Substrates, which Require Herp. *Molecular Cell* 28: 544–554. doi:10.1016/j.molcel.2007.09.012.
48. Molinari M (2000) Chaperone Selection During Glycoprotein Translocation into the Endoplasmic Reticulum. *Science* 288: 331–333. doi:10.1126/science.288.5464.331.
49. Chwetzoff S, TRUGNAN G (2006) Rotavirus assembly: an alternative model that utilizes an atypical trafficking pathway. *Curr Top Microbiol Immunol* 309: 245–261.
50. Li S, Kong L, Yu X (2013) The expanding roles of endoplasmic reticulum stress in virus replication and pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology*: 1–15. doi:10.3109/1040841X.2013.813899.
51. Maurel M, Chevet E, Tavernier J, Gerlo S (2014) Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in Biochemical Sciences* 39: 245–254. doi:10.1016/j.tibs.2014.02.008.
52. Sen A, Pruijssers AJ, Dermody TS, Garcia-Sastre A, Greenberg HB (2011) The Early Interferon Response to Rotavirus Is Regulated by PKR and Depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3. *J Virol* 85: 3717–3732. doi:10.1128/JVI.02634-10.
53. Arnold MM, Sen A, Greenberg HB, Patton JT (2013) The Battle between Rotavirus and Its Host for Control of the Interferon Signaling Pathway. *PLoS Pathog* 9:

e1003064. doi:10.1371/journal.ppat.1003064.g002.

54. Cláudio N, Dalet A, Gatti E, Pierre P (2013) Mapping the crossroads of immune activation and cellular stress response pathways. *The EMBO Journal* 32: 1214–1224. doi:10.1038/emboj.2013.80.
55. Sapin C, Colard O, Delmas O, Tessier C, Breton M, et al. (2002) Rafts promote assembly and atypical targeting of a nonenveloped virus, rotavirus, in Caco-2 cells. *J Virol* 76: 4591–4602. doi:10.1128/JVI.76.9.4591–4602.2002.
56. Shaw RD, Vo PT, Offit PA, Coulson BS, Greenberg HB (n.d.) Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus rotavirus. *Virology* 155: 434–451.
57. Pothier P, Kohli E, Drouet E, Ghim S (n.d.) Analysis of the antigenic sites on the major inner capsid protein (VP6) of rotaviruses using monoclonal antibodies. *Ann Inst Pasteur Virol* 138: 285–295.
58. Burns JW, Greenberg HB, Shaw RD, Estes MK (1988) Functional and topographical analyses of epitopes on the hemagglutinin (VP4) of the simian rotavirus SA11. *J Virol* 62: 2164–2172.
59. Roseto A, Scherrer R, Cohen J, Guillemin MC, Charpilienne A, et al. (1983) Isolation and characterization of anti-rotavirus immunoglobulins secreted by cloned hybridoma cell lines. *J Gen Virol* 64 (Pt 1): 237–240.
60. Fabbretti E, Afrikanova I, Vascotto F, Burrone OR (1999) Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J Gen Virol* 80 (Pt 2): 333–339.
61. Aponte C, Mattion NM, Estes MK, Charpilienne A, Cohen J (n.d.) Expression of two bovine rotavirus non-structural proteins (NSP2, NSP3) in the baculovirus system and production of monoclonal antibodies directed against the expressed proteins. *Arch Virol* 133: 85–95.
62. Schagger H (2001) Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol* 65: 231–244.
63. Pappin DJC, Hojrup P, Bleasby AJ (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current Biology* 3: 327–332.
64. Nadanaka S, Yoshida H, Kano F, Murata M, Mori K (2004) Activation of mammalian unfolded protein response is compatible with the quality control system operating in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 15: 2537–2548. doi:10.1091/mbc.E03-09-0693.
65. Delmas O, Durand-Schneider AM, Cohen J, Colard O, Trugnan G (2004) Spike Protein VP4 Assembly with Maturing Rotavirus Requires a Postendoplasmic Reticulum Event in Polarized Caco-2 Cells. *J Virol* 78: 10987–10994. doi:10.1128/JVI.78.20.10987-10994.2004.
66. Rojas M, Arias CF, Lopez S (2010) Protein Kinase R Is Responsible for the Phosphorylation of eIF2 in Rotavirus Infection. *J Virol* 84: 10457–10466. doi:10.1128/JVI.00625-10.
67. Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, Arvisais E, Kaufman RJ, et al. (2003) Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol* 23: 7198–7209.

68. Cullinan SB, Diehl JA (2006) Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 317–332. doi:10.1016/j.biocel.2005.09.018.
69. Kwak M-K, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, et al. (2003) Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* 278: 8135–8145. doi:10.1074/jbc.M211898200.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *Characterization of virus-derived VP6-containing complexes in Rotavirus-infected MA-104 cells.* Left panels (A-D): a cytoplasmic fraction of MA-104 cells infected for 6 hours was submitted to velocity sedimentation at 110,000 x g for 2 h through a 15-50 % sucrose gradient. Eleven fractions were collected and analyzed. (A) 10% SDS-PAGE and WB analysis using anti-rotavirus VP2, VP4, VP6, NSP2, NSP5 and VP7 monoclonal antibodies. (B) Distribution profile of rotavirus negative strand RNAs encoding VP2 and VP6 proteins. Fractions were collected and submitted to real-time qPCR to quantify negative strand viral RNAs relative to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA, used as a reference gene. White bars: VP2 mRNA; black bars: VP6 mRNAs. (C) WB analysis using anti-ribosomal protein S6 antibodies for the presence of polysomes. (D) Blue native-PAGE (BN-PAGE) separation of gradient fractions analyzed by WB using an anti-rotavirus antiserum. Three main complexes were identified: heavy, H; intermediate, I; light, L. Right panels (E-H): fractions 1 to 3 from the 15-50% sucrose gradient (see [Figure 1A](#)), corresponding to densities ranging from 1.044 to 1.093 mg/mL, were pooled and further analyzed through a 15-30% linear sucrose density equilibrium gradient centrifugation at 110,000g for 18 hours. Eleven fractions were collected and analyzed using: (E) SDS-PAGE and WB analysis as in panel A, (F) qPCR as in panel B, (G) WB analysis using anti-ribosomal protein S6 antibody as in panel C and (H) blue native-PAGE (BN-PAGE) and WB as in panel D.

Figure 2. *Immunopurification of macromolecular complexes from rotavirus-infected MA-104 cells using anti-rotavirus VP6 antibody.* Fractions 2-6 of the 15-30% sucrose density gradient, corresponding to densities ranging from 1.068 to 1.084 mg/mL (see [Figure 1E-H](#)) were pooled, dialysed and incubated with Sepharose conjugated anti-rotavirus VP6 monoclonal antibodies (mAb RV138). (A) WB analysis of viral proteins separated using a 10% SDS-PAGE.

Anti-rotavirus monoclonal antibodies against VP2, VP4, VP6, NSP2, NSP5 and VP7 were used. The “Input” lane corresponds to the pooled sample before immunopurification. The “Wash” lanes correspond to the three washing steps of Sepharose-immobilized anti VP6 immunoglobulins. The “Elution” lanes correspond to the four-elution steps of immobilized anti VP6 immunoglobulins. (B) BN-PAGE analysis of the same immunopurification fractions stained with Coomassie brilliant blue.

Figure 3. *2-D BN/SDS-PAGE of fractionated and immunopurified rotavirus-infected MA-104 cells.* (A) Rotavirus-infected or (B) mock-infected cytoplasmic fractions of MA-104 cells immunopurified as described in fig. 2B (“elution fractions”) were separated on a 2D BN-PAGE/SDS-PAGE and then stained, using Colloidal Brilliant Coomassie Blue. Protein spots were surrounded in black and numbered. Identification and classification of the numbered spots is displayed in Table I. Heavy (H), Intermediate (I) and light (L) complexes are delimited. Molecular weights are indicated.

Figure 4. *Venn diagram of proteomics data.* Data from Table I were used to graphically represent the 4 categories of cellular protein recovered in rotavirus-derived VP6-containing complexes. Color code as in Table I. The surface of each ellipse is proportional to the number of proteins in a given category, as well as the surface of intersections.

Figure 5. *Immunofluorescence and confocal imaging of select cellular chaperones, viral structural proteins and viral dsRNA.* MA-104 cells, grown on glass slides, were stained with monoclonal antibodies directed against BiP/GRP78, PDI, CANX, and dsRNA and polyclonal antibodies against rotavirus structural proteins (rabbit RF138 or goat RF925). Panel A: Mock infected MA-104 cells. Panels B-D: MA-104 cells infected for 6h with rotavirus. Rotavirus infection induced a relocalization of the chaperones studied either within structures resembling viroplasms or in smaller dots within and outside the ER. Arrows point to examples of colocalization between the analyzed molecules. Enlargement of selected boxes are displayed.

Figure 6. *Immunofluorescence and confocal imaging of rotavirus VP6 and VP2, BiP/GRP78, CANX and PDI.* MA-104 cells, grown on glass slides and infected for 6h, were stained with monoclonal antibodies directed against BiP/GRP78, PDI, CANX, and monoclonal antibodies against rotavirus structural proteins VP6 or VP2. Panel A and B: VP6, BiP/GRP78 and CANX

were co-stained and appeared to colocalize. Panel C: VP2, BiP/GRP78 and PDI were co-stained and appeared to colocalize. Arrows point to examples of colocalization between the analyzed molecules. Enlargement of selected boxes are displayed.

Figure 7. *Coimmunoprecipitation experiments between chaperone proteins and rotavirus structural proteins in MA 104-infected cells.* MA-104 cells were infected with rotavirus during 6 hours. Input lines correspond to WB performed before IP. IP lines correspond to WB performed after IP. Expected M_w are indicated with arrows. Panel A: cell lysates were immunoprecipitated with anti-rotavirus VP6 monoclonal antibody. Immunoprecipitates were separated by 10% SDS-PAGE then analyzed by WB using anti-Hsp90, anti-Hsp70, anti-Calreticulin or anti-PDI monoclonal antibodies. All the chaperones tested coimmunoprecipitated with VP6, indicating that a direct or indirect interaction exists. Panel B: cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-Hsp90, anti-Hsp70, anti-Calreticulin, anti-PDI or anti-BiP/GRP78 monoclonal antibodies. Immunoprecipitates were separated by 10% SDS-PAGE and then analyzed by WB using anti-rotavirus VP2, VP4, VP6 and VP7 monoclonal antibodies. VP2 and VP6 coimmunoprecipitated with all the chaperone tested, as VP7, except for calreticulin, whereas VP4 mostly coimmunoprecipitated with cytosolic chaperones.

Figure 8. *Effect of rotavirus infection on the UPR.* Panel A: MA-104 cells were infected for the indicated periods or mock-infected or treated with DTT (2 mM, for 1 h). RT-PCR was performed to analyze both the unspliced (XBP1u) and the spliced mRNA (xBP1s) encoding XBP1. Rotavirus infection induced a rapid and robust splicing of XBP1, indicating that this arm of the UPR was activated. Panel B: Cells, grown on glass coverslips, were transfected with an ATF6-GFP reporter cDNA, then either not treated (CTRL) or infected for 7h with RF rotavirus strain (RF 7hpi) or treated with 1 or 5 mM DTT for 1 h. They were stained with an anti-rotavirus RF-strain polyclonal antiserum (anti-RF) and DAPI. Confocal analysis indicated that upon DTT treatments or RV infection ATF6-GFP was clearly detectable in the nucleus, indicating that the ATF6 pathway of the UPR was activated.

Figure 9. *Immunofluorescence and confocal imaging of rotavirus structural proteins, CNX, rotavirus dsRNA, ATF6 and PERK.* Non-infected MA-104 cells were stained with monoclonal antibodies against CNX and ATF6 (panel A) or PERK (panel B) and displayed the expected

staining. MA-104 cells were infected with rotavirus for 6h, then stained with antibodies against dsRNA, goat antiserum against structural rotavirus proteins (RF925) or monoclonal antibodies against VP2, CNX and ATF6 (panel C) or PERK (panel D). ATF6 relocated mainly to structures resembling viroplasms and colocalized with viral RNA, viral proteins and CNX. PERK relocated to a perinuclear part of the ER and colocalized with viral RNA, viral proteins and CNX.

Figure 10. Effects of the pharmacological and genetic inhibition of the UPR on rotavirus replication. Panel A: MA-104 cells were infected for 16 h and either untreated or treated for 15h with a panel of pharmacological drugs specifically targeting given steps of the UPR arms. Rotavirus production was measured by plaque assays. Toy: toyocamycin (50 μ M); 4 μ 8C (20 μ M); GSK: GSK2606414 (20 μ M); 16F: 16F16 (10 μ M); Sal: salubrinal (20 μ M); Gua: guanabenz (20 μ M); 4 μ 8C+Sal: 4 μ 8C (20 μ M) plus salubrinal (20 μ M); Hon: honokiol (25 μ M); CHX: cycloheximide (20 μ M). Panel B: stable clones of Caco-2 cells (E2, E3, E4) expressing shRNA directed against ATF6 or control scrambled shRNA (CTL) were infected for 16h at MOI=4. Rotavirus production was measured by plaque assays. Results are represented as a percentage relative to mock treated cells. For each condition, three independent experiments of duplicate titrations were performed, using the same viral stock. Standard error bars are shown.

TABLE I. MALDI TOF-TOF MS identification of proteins separated by 2D-BN/SDS-PAGE.

Table I: MALDI TOF-TOF MS identification of proteins submitted to 2D-BN/SDS-PAGE							
complex	Spot n° (see Fig. 3)	Theoretical MW (kDa)	Protein name	SwissProt Accession Number	Mowse Score	% of recovery	Error (ppm)
Chaperone proteins							
H	2	90	Hsp90α	Q4R4P1	141	29	26
H	2	90	Hsp90β	Q4R4T5	120	26	24
H+I	3	70	Hsp70	Q28222	72	10	26
H+I	3	70	Hsc70	P11142	431	35	20
L	12	20	TCTP	P13693	85	41	14
ER-associated chaperones							
I	4	78	Grp78	P11021	173	24	26
L	6	60	Calreticulin	Q4VIT5	133	24	30
L	6	57	PDI	Q2HWU2	117	28	45
Actin interacting proteins							
H	1	104	α actinin 4	Q43707	193	24	38
H+I	3	69	Ezrin (Villin 2)	Q4VX75	221	33	60
H	7	51	CAP-1	Q4R4I6	139	11	42
H	9	36	GAPDH	Q5RAB4	49	24	29
I	4	85	Gelsolin	P06396	117	17	25
L	11	30	CapZα1	Q5R507	73	37	17
H	10	28	Tropomyosin α 4	P67936	114	53	20
L	11	27	14-3-3 ζ	Q6P3U9	100	44	32
L	11	29	14-3-3 ε	P62258	67	41	9
H	9	39	FBPA	P04075	64	26	44
Hsp interacting proteins							
L	12	32	SET protein (I-2PP2A)	Q01105	58	11	6
I	4	82	DPP3	Q9NY33	250	19	29
I	5	62	STIP-1	Q4R8N7	94	53	19
Viral proteins							
I	8	48	VP6	P04509	56	39	60
H	9	33	VP7	P32547	NS	10	96
H	9	37	NSP2	P03538	NS	9	77
Non specific proteins							
	A	127	DDB1	P33194	77	42	35
	B	70	SSA	A2V9Z4	108	4	7
	C	36	Annexin 5	Q4R4H7	86	74	18

Spots numbered according to Figure 3 were scrapped, analyzed and identified by MALDI TOF and MALDI TOF-TOF MS. They were classified according to their recognized functions within 4 groups of cellular proteins (see text). CAP-1: Adenylyl cyclase associated protein 1; FBPA: Fructose bis phosphate aldolase; PDI: Protein disulfide isomerase; DPP3: dipeptidyl peptidase 3; TCTP: translationnaly controlled tumor protein; STIP-1: stress induced phosphoprotein 1; DDB1: DNA Damage Binding Protein 1; SSA: Simian serum Albumin.

SUPPORTING INFORMATION

Figure S1. *Indirect immunofluorescence colocalization of Hsp70 with rotavirus structural proteins in MA 104 infected cells.* MA-104 cells were infected or not with RF strain rotavirus for 4, 6 or 8 hours then fixed and permeabilized. Permeabilized cells were incubated with anti-Hsp70 mouse monoclonal and rabbit anti-RF rotavirus polyclonal serum. Anti-Hsp70 antibodies were revealed using anti-mouse IgG - FITC labeled antibodies (green). Rabbit polyclonal anti-RF rotavirus serum was visualized using Cy3 labeled anti-rabbit antibodies (red). Data were acquired by confocal microscopy. Images represent the median confocal sections (z3/5). Merged images were obtained by superposition of the green and red channels. Inserts represent an enlargement of the indicated area.

Figure S2. *Indirect immunofluorescence colocalization of Hsp90 with rotavirus structural proteins in MA 104 infected cells.* MA-104 cells were infected or not with RF strain rotavirus for 4, 6 or 8 hours then fixed and permeabilized. Permeabilized cells were incubated with anti-Hsp90 mouse monoclonal and rabbit anti-RF polyclonal serum. Anti-Hsp90 antibodies were revealed using anti-mouse IgG - FITC labeled antibodies (green). Rabbit polyclonal anti-RF serum was visualized using Cy3 labeled anti-rabbit antibodies (red). Data were acquired by confocal microscopy. Images represent the median confocal sections (z3/5). Merged images were obtained by superposition of the green and red channels. Inserts represent an enlargement of the indicated area.

Figure S3. *Indirect immunofluorescence colocalization of Calreticulin with rotavirus structural proteins in MA 104 infected cells.* MA-104 cells were infected or not with RF strain rotavirus for 4, 6 or 8 hours then fixed and permeabilized. Permeabilized cells were incubated with anti-Calreticulin mouse monoclonal and rabbit anti-RF rotavirus polyclonal serum. Anti-Calreticulin antibodies were revealed using anti-mouse IgG - FITC labeled antibodies (green). Rabbit polyclonal anti-RF rotavirus serum was visualized using Cy3 labeled anti-rabbit antibodies (red). Data were acquired by confocal microscopy. Images represent the median confocal sections (z3/5). Merged images were obtained by superposition of the green and red channels. Inserts represent an enlargement of the indicated area.

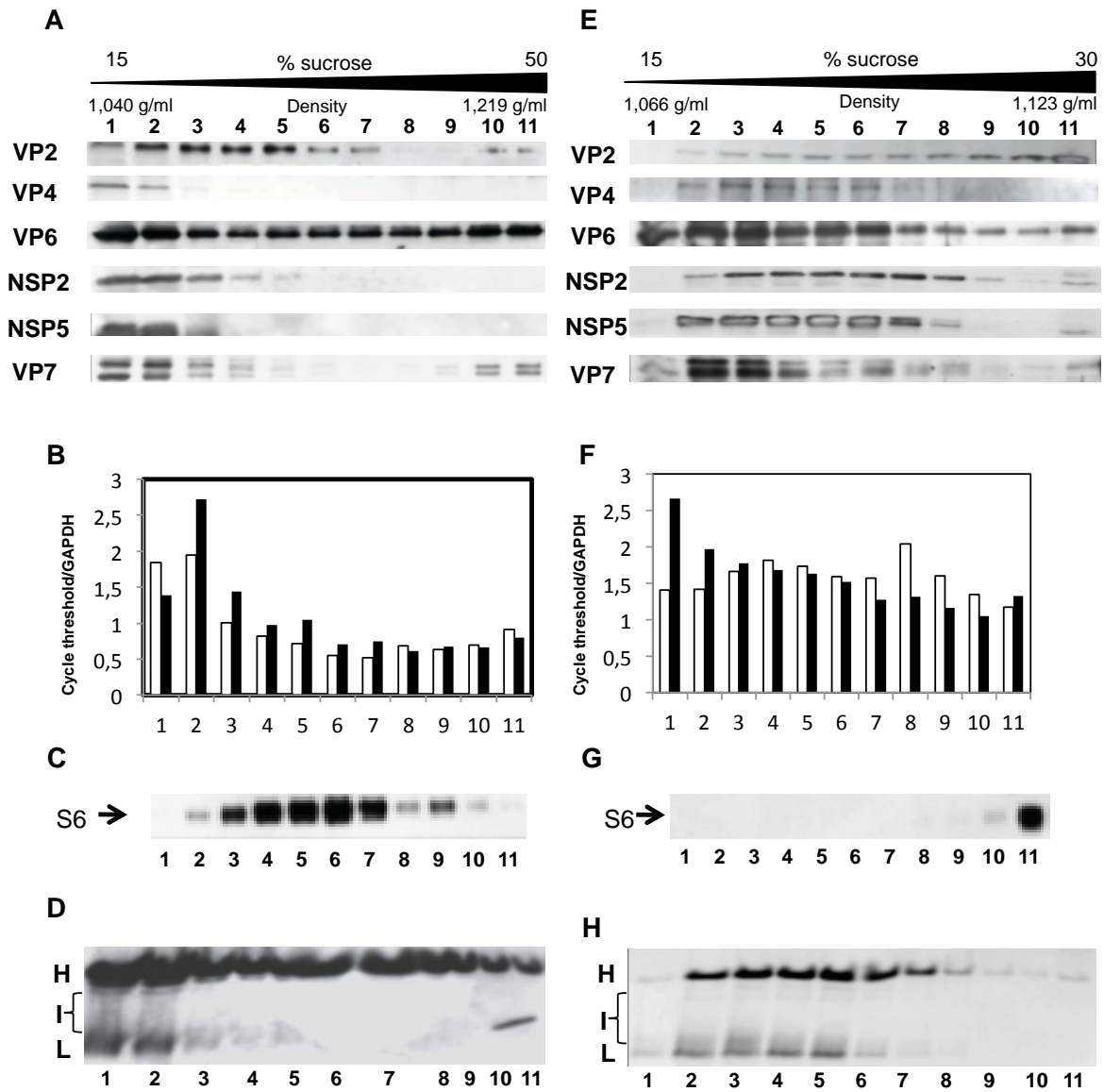


Figure 1

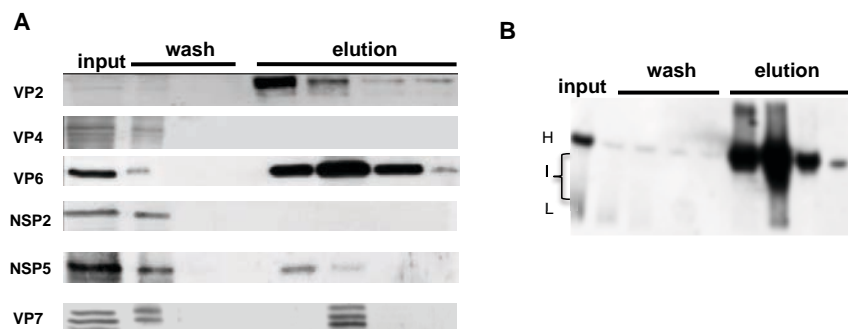


Figure 2

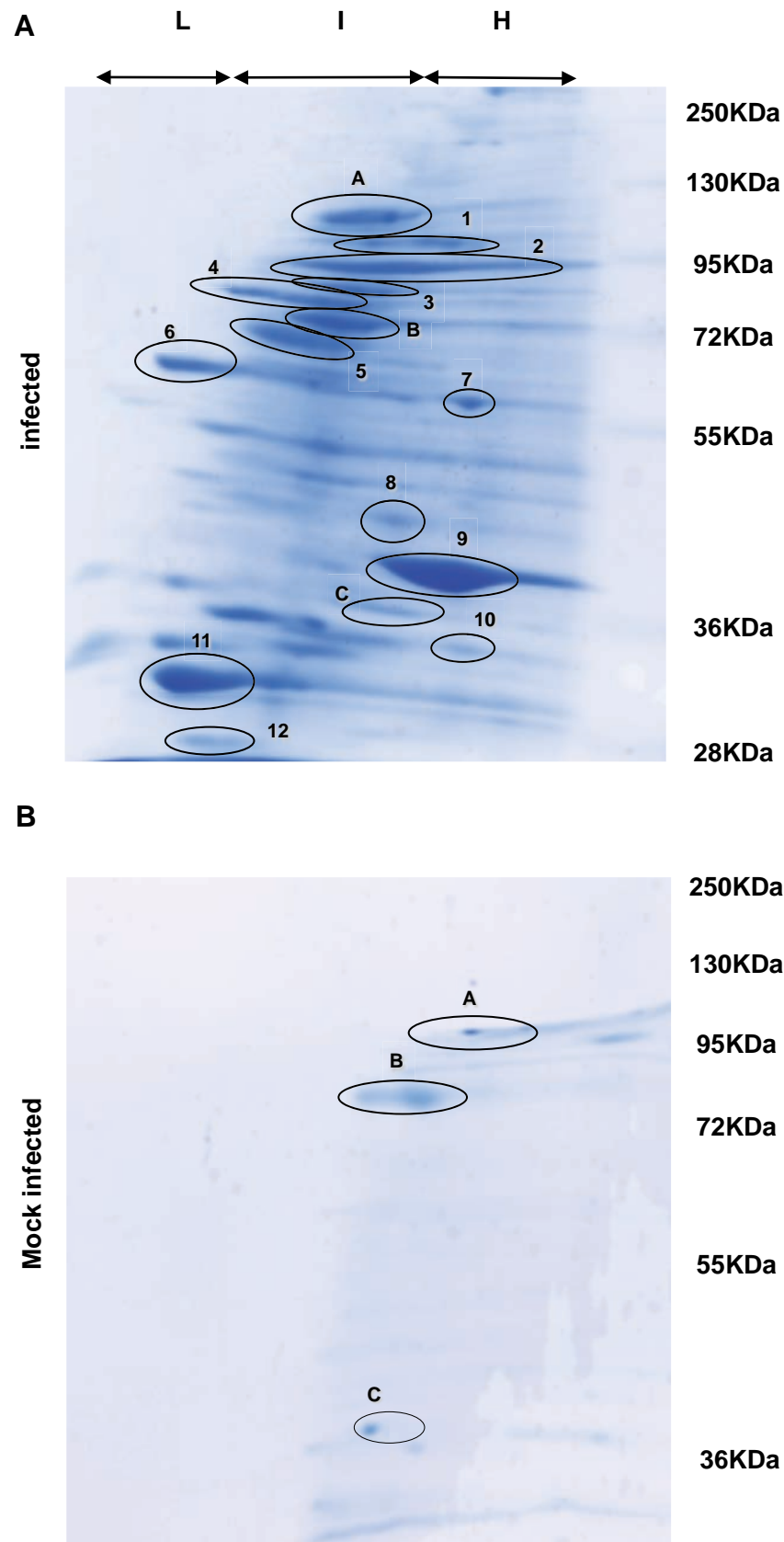


Figure 3

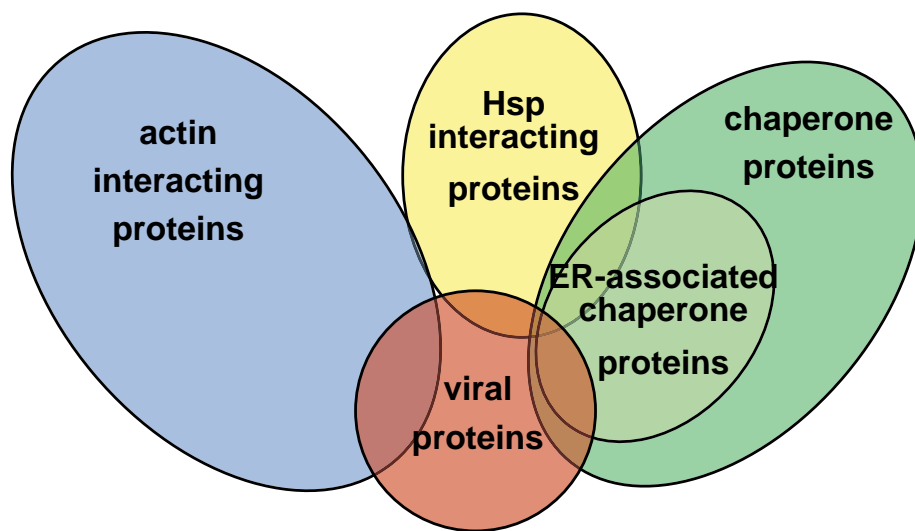


Figure 4

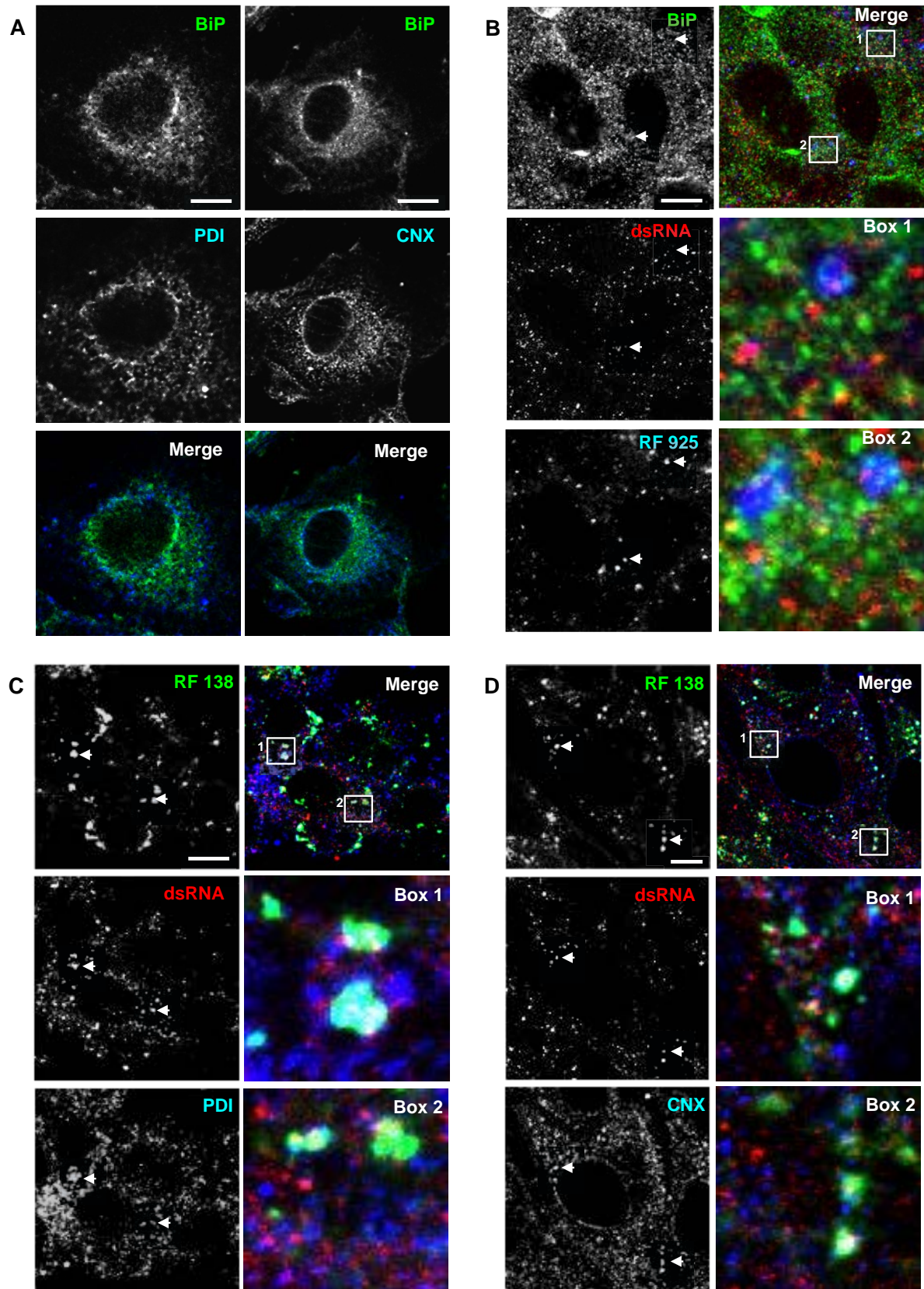


Figure 5

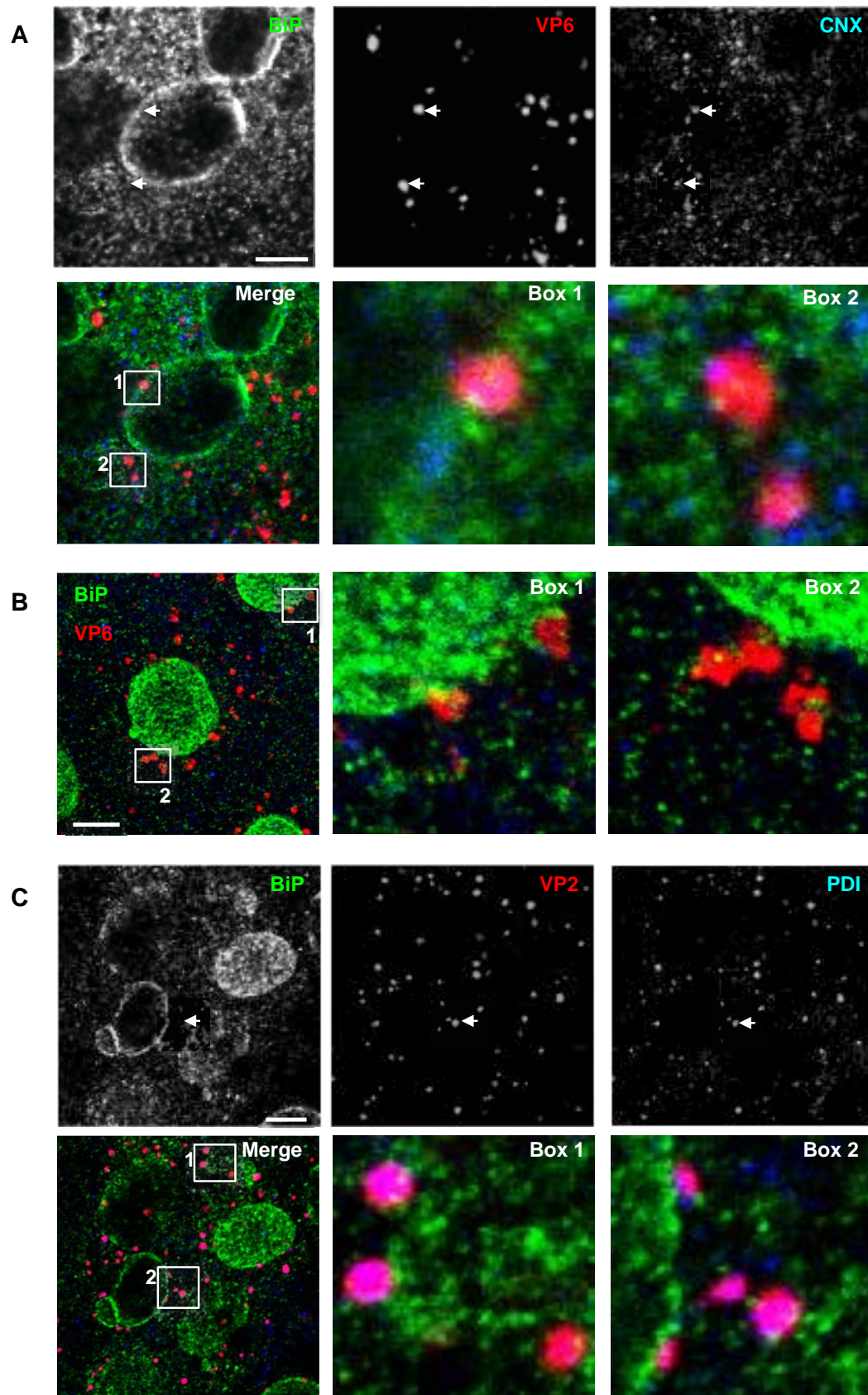


Figure 6

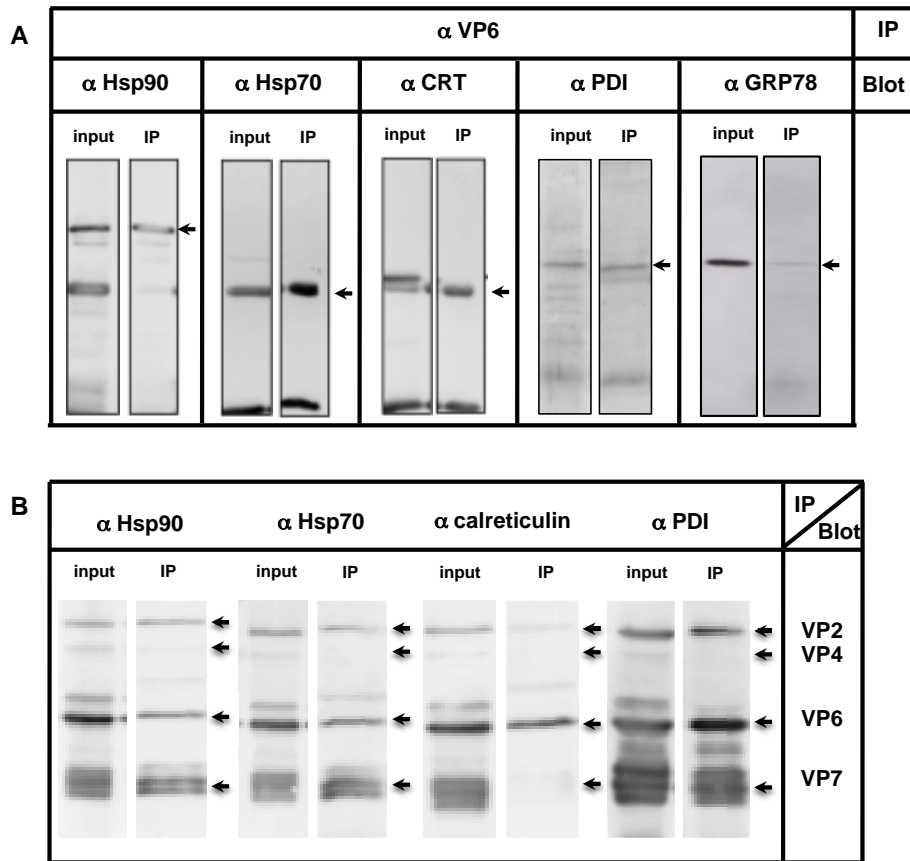


Figure 7

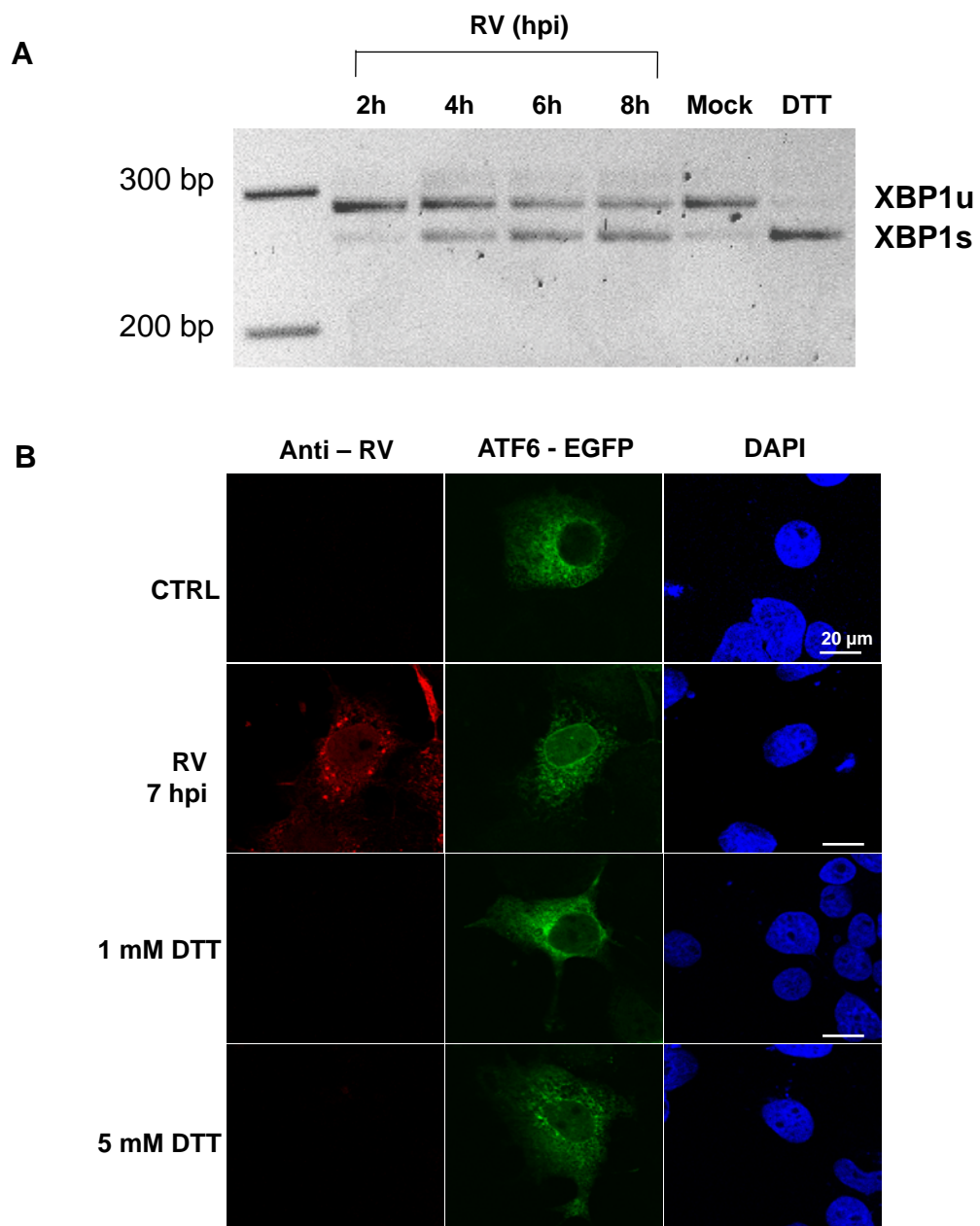


Figure 8

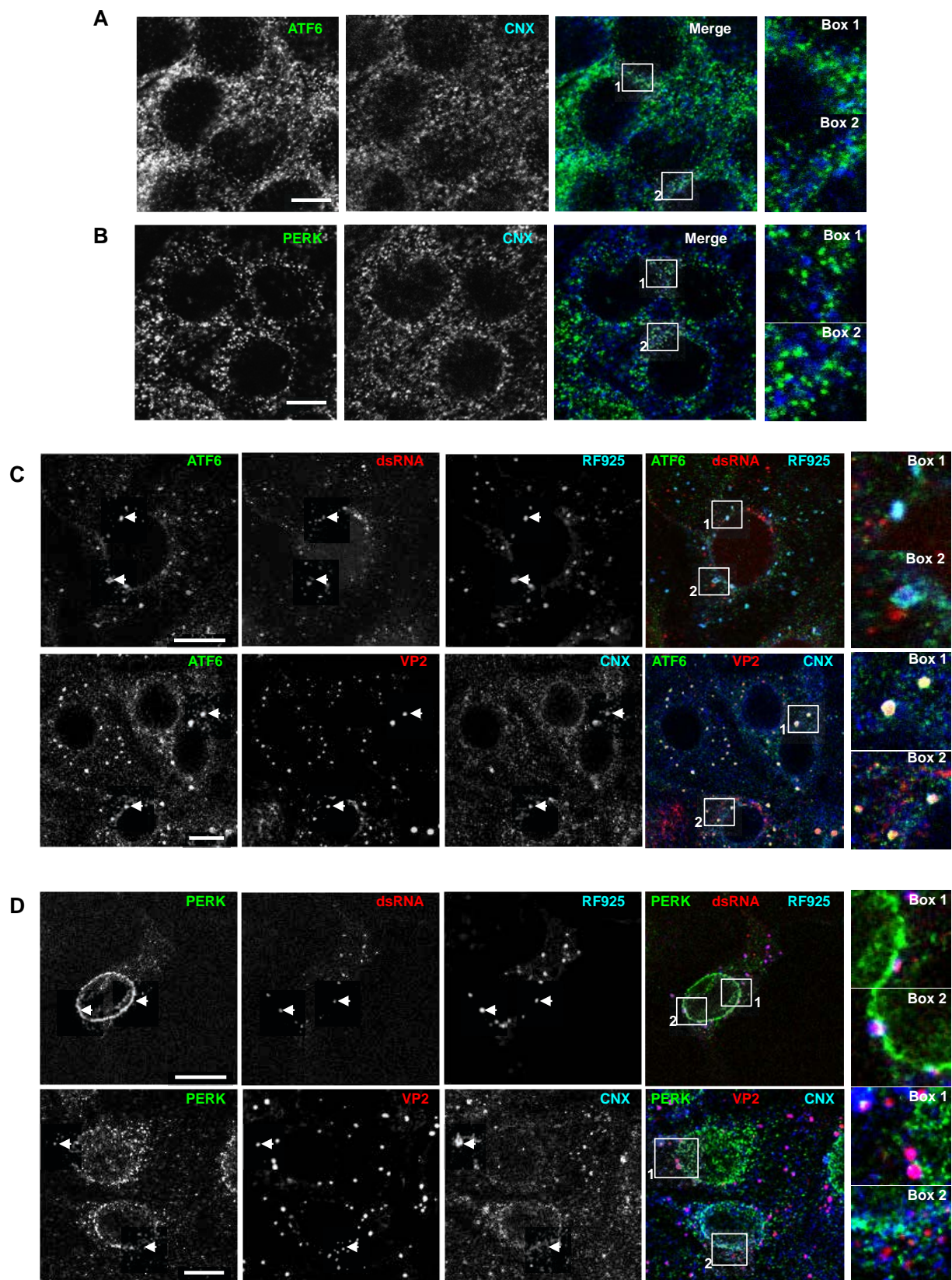


Figure 9

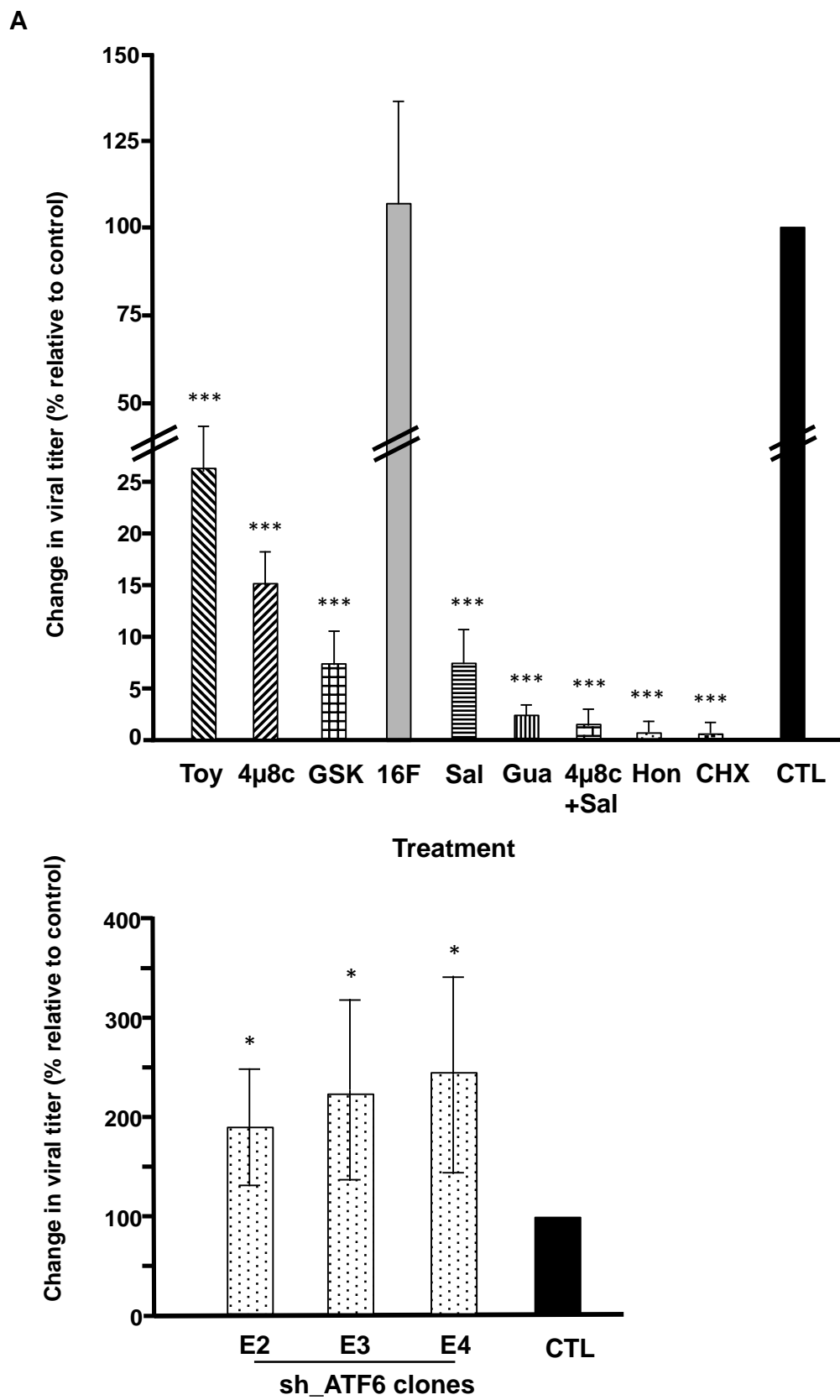


Figure 10

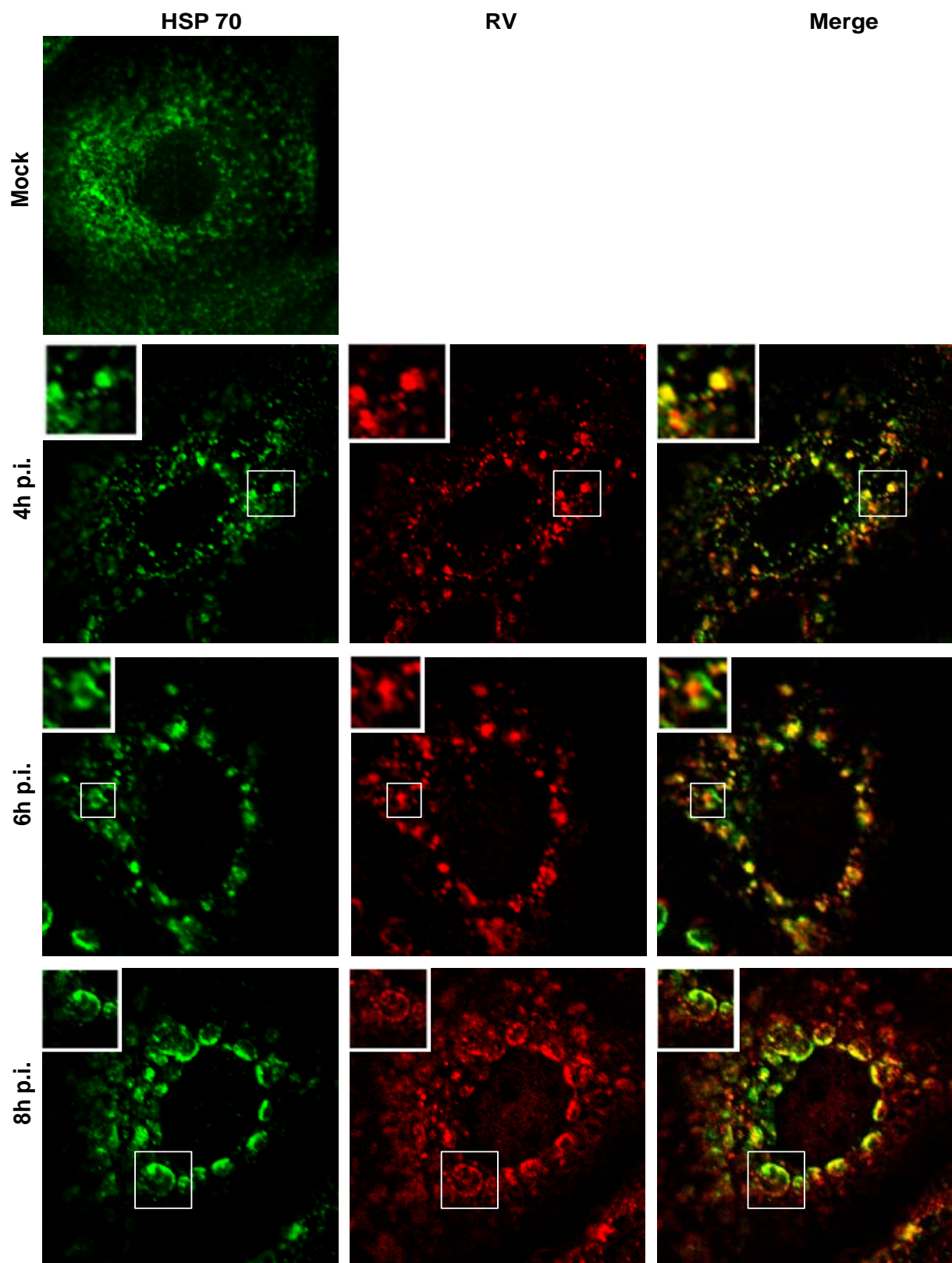


Figure S 1

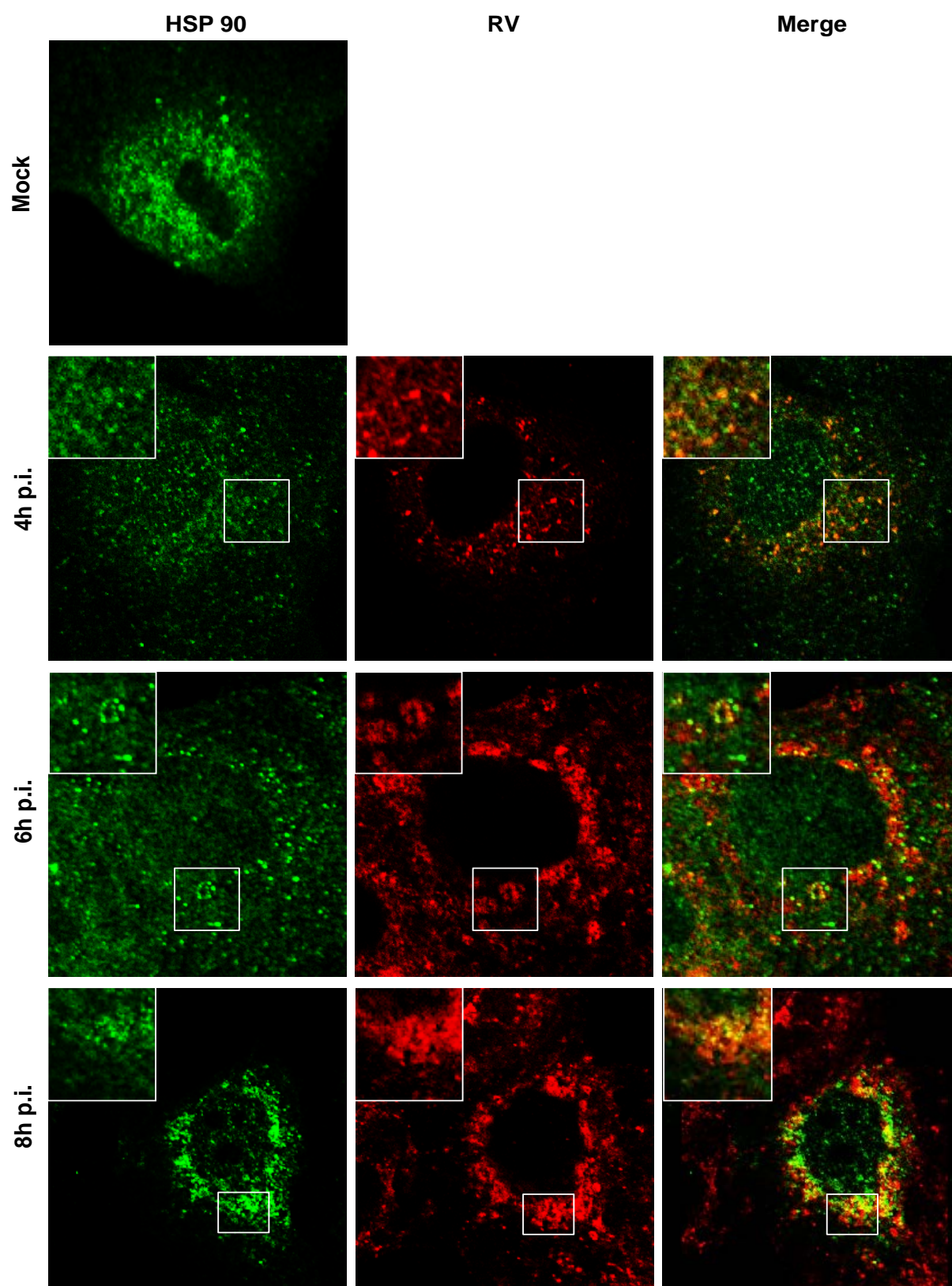


Figure S 2

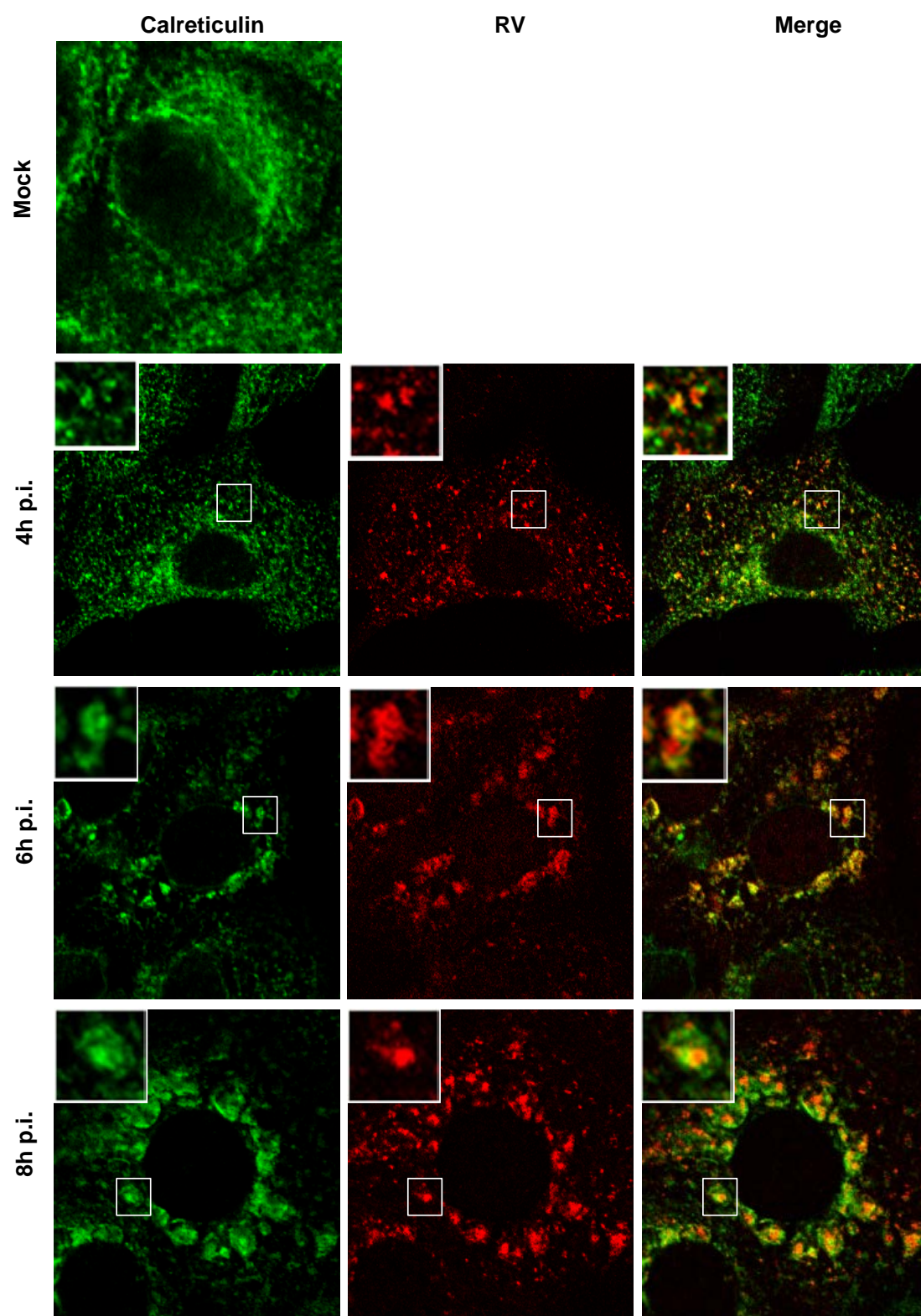


Figure S 3

Chapitre II :

L'infection à rotavirus bloque la formation et la maturation des autophagosomes mais induit une lipodation de LC3 non associée à l'autophagie dans les cellules Caco-2

1. Résumé des résultats

Le deuxième volet de ma thèse s'inscrit dans le contexte où le rôle de l'autophagie dans la morphogénèse du rotavirus reste en débat (Arnoldi et al., 2014; Crawford et al., 2012) et que le modèle cellulaire MA104 utilisé dans les études antérieures ne serait pas judicieux pour adresser un rôle potentiel de l'autophagie dans le trafic non conventionnel du rotavirus.

Nous avons procédé à l'étude de l'autophagie dans les cellules humaines Caco-2, issues d'un adénocarcinome colique et capable de se différencier spontanément en cellules à phénotype *enterocyte-like* proche de la cible naturelle du rotavirus. Nous avons tout d'abord montré que quelque soit l'état de différenciation des cellules Caco-2, le rotavirus adopte un cycle non lytique.

La caractérisation du statut autophagique basal des cellules Caco-2 a montré que les cellules différenciées expriment à un niveau plus élevé un ensemble de marqueurs autophagiques, mais possèdent un flux autophagique réduit.

Quel que soit l'état de différenciation des cellules, l'infection à rotavirus bloque à la fois l'initiation et les étapes tardives de l'autophagie. Cependant, uniquement dans les cellules Caco-2 non différenciées, l'infection induit une lipodation de la protéine LC3 qui n'est pas associée à l'autophagie, mais qui corrèle avec un clivage de la protéine ATG3 directement impliquée dans le processus de lipodation. Ni l'autophagie, ni la lipodation de LC3 ne sont requises pour la morphogénèse du rotavirus dans les cellules Caco-2.

Ces résultats ont fait l'objet d'un deuxième manuscrit en cours de soumission pour publication.

2. Manuscript

Rotavirus Blocks Autophagy Initiation and Fusion Steps but Induces an Autophagy-independent LC3 Lipidation in Intestinal Epithelial Caco-2 Cells.

Lan Trang Vu^{1,2}†, Sarah Duponchel^{1,2}†, Sophie Ancel^{1,2}, Marie Christine Ruiz³, Fabian Michelangeli³, Aurélie Schnuriger^{1,2}, Antoine Garbarg-Chenon^{1,2}, Patrice Codogno⁴, Serge Chwetzoff^{1,2,5}* and Germain Trugnan^{1,2}*

¹ INSERM ERL U1157/UMR7203, team 4 “Micro-organismes, biomolécules et physiopathologie intestinale“, Faculty of Medicine Saint Antoine, 27 rue Chaligny, 75012 Paris, France

² University Pierre et Marie Curie, UMR7203, 4 place Jussieu 75005 Paris, France

³ Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal, Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas, Venezuela

⁴ Institut Necker Enfants-Malades (INEM), INSERM U1151-CNRS UMR 8253; University Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité, 14, rue Maria Helena Vieira Da Silva CS61431 75993 Paris cedex 14, France

⁵ INRA, department Animal health, Molecular Virology and Immunology (VIM), 78350 Jouy en Josas, France

† These authors contributed equally to the work

* Corresponding authors, to whom reprint request should be addressed

Short Title: Rotavirus blocks autophagy and modulates LC3 lipidation

Keywords: rotavirus, autophagy, LC3 lipidation, intestinal epithelial cells, differentiation

ABSTRACT

Autophagy may represent a first line of cell defense by carrying virus or viral components to lysosomes, leading to virus elimination. Thus, viruses have evolved a large array of mechanisms to avoid autophagic degradation. Whether autophagy may be involved in the morphogenesis of rotavirus was investigated in the present work. We used here Caco-2 cells, an intestinal epithelial cell line that mimics the natural target of rotavirus. We first observed that the autophagic status was strongly dependent on cell differentiation, i.e. differentiated Caco-2 cells express higher levels of major ATG proteins involved in autophagy initiation and showed a decreased autophagic flux, leading to autophagosomes accumulation. Rotavirus infection (i) didn't apparently modify the steady state of basal autophagy in both undifferentiated and differentiated cells, (ii) blocked the initiation and fusion steps in both conditions (iii) specifically increased LC3 lipidation in undifferentiated cells and (iv) didn't promote interactions between rotavirus and autophagosomes. Conversely manipulation of autophagy with chloroquine and/or rapamycin did not affect virus production, indicating that the autophagic process was disconnected from virus morphogenesis. Using siRNAs against BECN1 or ATG13 we demonstrated that rotavirus-induced LC3 lipidation, observed in undifferentiated cells, was independent on canonical autophagy. Interestingly, however, we found that ATG3 was specifically cleaved in infected cells in a way that paralleled the increased LC3 lipidation. Our results indicated that neither autophagy, nor LC3 lipidation nor even LC3 expression played a role in rotavirus production in Caco-2 cells.

INTRODUCTION

Viruses display a rather high tissue and cell type specificity and have developed strategies for entry, replication, assembly and exit that are precisely fitted to their natural cellular targets. Rotavirus, for example, is known to specifically infect cells from the villus tip of the small intestine of young animals and humans and to be released mostly from the apical side of the mucosa ^{1,2}, even if in some instance a basolateral release may happen, associated with a systemic distribution and some rare and severe extra-intestinal localization ³. Cellular models, such as HT-29 or Caco-2 cell lines, that mimic polarized and differentiated enterocytes ⁴, have been used to study the mechanisms of rotavirus assembly and trafficking ^{5,6}. More recently human enteroids, derived from intestinal epithelial stem cells, have been introduced as an *ex-vivo* model to study host-pathogen interactions and were shown to be adapted to rotavirus studies ⁷. Former studies demonstrated that, in differentiated Caco-2 cells, rotavirus assembly starts in cytoplasmic virus factories, the viroplasms, then continues within the ER ^{5,8} as well as in an extra-reticular compartment ⁹ and finishes with the release of neo-virions mostly at the apical side of the monolayer without significant cell lysis ^{6,10,5}. These results were in good agreement with data obtained *in vivo* in the human as well as in animal models ^{1,2}. The apical polarized release of rotavirus particles is a still ill defined actin- and raft-dependent pathway ^{11,8,12} that by-pass the Golgi apparatus ⁵, suggesting that rotavirus likely uses one of the recently described unconventional trafficking route ¹³ in a polarized manner ^{14,15}. Surprisingly, most of the studies on the mechanisms of rotavirus entry, assembly and trafficking have been performed in an unrelated cell line, namely MA104, derived from monkey kidney, that are not polarized nor differentiated. In these cells, rotavirus morphogenesis includes an assembly step of double-layered particles (DLPs) within viroplasms followed by the formation of triple layered particles (TLPs) within the ER ¹⁶. It has been proposed that, following assembly, neo-virions release proceeds through cell lysis ^{17,18}. However cellular and molecular mechanisms of rotavirus exit in these cells remain unclear.

Several studies have been developed in order to better understand these virus assembly and release mechanisms in MA104 cells. Notably, it has been recently shown that rotavirus infection induces an ER stress and an unfolded protein response (UPR) ^{19,20} that most likely contributes to critical steps of virus morphogenesis (Vu et al. submitted paper). In line with these results, a recent study proposed that autophagy could be elicited in rotavirus-infected MA104 cells through the activation of CaMKK β , a Ca²⁺-dependent kinase that activates AMPK and inhibits mTOR ²¹. In this work, the authors also indicated that the autophagic flux

was blocked before the fusion of autophagosomes with lysosomes, thus suggesting that rotavirus hijacks the autophagic machinery for its morphogenesis. Contradictory results were presented in a more recent study, where the authors showed that the number of autophagosomes did not increase in rotavirus-infected MA104 cells, even if one of the characteristic markers of autophagy, namely the increase in LC3 lipidation (see below), was observed ²². This led the authors to the conclusion that LC3 lipidation but not autophagy was involved in rotavirus morphogenesis.

Autophagy is a highly regulated self-cannibalism process that allows the clearance of cytoplasmic proteins and organelles, and ensures the renewal of cell components, thus contributing to cellular homeostasis, cell survival in physiological and pathological contexts ²³ and cell differentiation ²⁴. More recently autophagy has also been proposed as a physiological secretory mechanism that may contribute to the above-mentioned unconventional secretory pathways ²⁵. More than 30 autophagy-related proteins (ATGs proteins) have been characterized. They ensure the successive steps of the autophagic molecular machinery, namely the formation of an isolation membrane (the phagophore), the non-specific or specific recruitment of cargos, the elongation and closure of the phagophore leading to the formation of autophagosomes and the fusion with lysosomes ²⁶ or with other organelles. In mammals, canonical autophagy starts with the activation of two complexes, namely the Unc-51-like kinase 1/2 (ULK 1/2) complex and the class III Phosphatidyl-Inositol-3-kinase (PI3K) complex, which are required for the recruitment of others component of the autophagic machinery to the isolation membrane ²⁶. One of them is the cytoplasmic protein microtubule-associated light-chain-3 protein (LC3), which would be anchored to isolation membranes thanks to its lipidation with phosphatidyl-ethanolamine (PE) ²⁷, contributing to the phagophore elongation ²⁸. LC3 lipidation is now recognized as a good marker of autophagy ²⁹. Autophagy may be easily manipulated by interfering with regulation mechanisms. For example, rapamycin is a drug that increases autophagy initiation by inhibiting mTORC1 ³⁰. Chloroquine or bafilomycin, two drugs that increase the lysosomal pH, are able to block the fusion between autophagosomes and lysosomes, thus leading to an increase of the number of autophagosomes, due to a blockade of the autophagic flux, i.e. the amount of autophagosomes that fuses with lysosomes.

In pathological conditions, such as viral infections, autophagy may represent a first line of immune response by carrying virus or viral components to lysosomes through xenophagy, a specialized form of autophagy, leading to virus elimination ³¹. Thus, viruses have evolved a large array of mechanisms to avoid autophagic degradation. For example, a

group of viruses directly block the initiation of autophagy, as shown for HIV-1³², members of the *Herpesviridae* family^{33–35}. Interestingly, most of the viruses that hijack the autophagic machinery have developed strategies to block the late stage of autophagosomes fusion with lysosomes^{36–38}. Several viruses, such as Poliovirus, a non-enveloped virus, uses autophagic membranes for its replication and also for a non-lytic release from host cells³⁹. Other related viruses, that includes the ARNsb (+) viruses, exploits still incompletely characterized membrane remodeling processes for their own morphogenesis through the formation of double membrane vesicles (DMV), that are thought to participate to autophagosome formation⁴⁰.

In the present work, we investigated whether autophagy or parts of the autophagic machinery may be involved in the morphogenesis and/or the atypical trafficking of rotavirus. Because previous studies have produced contradictory results in MA104 cells and because these cells do not correctly represent the natural target of rotavirus, we performed our work in Caco-2 cells. We take advantage of the property of this cell line to undergo a spontaneous differentiation as a function of time in culture⁴¹. Rotavirus infection was studied in both undifferentiated and differentiated cells. We first observed that the autophagic status was dependent on the state of cell differentiation, i.e. an increased number of autophagosomes and an increased level of LC3 lipidation in differentiated as compared to undifferentiated cells, associated with a significant decrease of the autophagic flux. Rotavirus infection was associated with a rather complex pattern: LC3 lipidation was significantly increased in undifferentiated cells, but not in differentiated cells; the autophagic flux was reduced whatever the conditions analyzed and, strikingly, the number of autophagosomes did not increase in both undifferentiated and differentiated Caco-2 cells. This lead us to analyze carefully the autophagic machinery and to show that autophagy, *per se*, was not involved in rotavirus morphogenesis, even if LC3 lipidation may be modified in some instance. The possible explanations of these new results will be discussed.

RESULTS

The autophagic status of Caco-2 cells strongly depends on the differentiation state.

Since our goal was to study the relationships between rotavirus infection and autophagy in intestinal cells, we first analyzed the expression of markers characteristic of autophagy initiation in Caco-2 cells as a function of their differentiation state. It is well known that these cells undergo a differentiation process as a function of cell growth. As shown in **Figure 1A**,

we found that, as expected, the localization of 525 antigen, a classical basolateral marker ⁴² and of saccharase-isomaltase (SI, a classical apical marker of small intestine ⁴ changed as cell polarization and differentiation takes place. The basolateral marker started to be localized quite early (day 3-4 post-seeding) at the basolateral membrane (differentiating cells), whereas SI was targeted to the apical membrane, only after the formation of tight junctions (we chosen to study these differentiated cells at 21 days post-seeding to ensure correct differentiation). A first analysis of autophagic markers was performed using a quantitative real-time PCR (qPCR) analysis of LC3 expression and showed a 5-fold higher LC3 mRNA level in differentiated cells (**Figure 1B**). This prompted us to analyze the expression of some other markers associated with autophagy initiation. While ATG7 protein was equally expressed in cells at both differentiation states, as revealed by western blot, the level of ATG5-ATG12, ATG4B and ATG16L1 were higher in differentiated cells (**Figure 1C**, compare lanes 1, 2, 3 to lanes 7, 8, 9). We hypothesized that this might be directly linked to the differentiation process, since liver kinase B1 (LKB1), a master gene that governs cellular polarity ⁴³, is also known as a regulator of autophagy through AMPK and mTOR ⁴⁴. We indeed found that LKB1 was highly expressed in differentiated cells and undetectable in undifferentiated cells (**Figure 1C** compare lanes 1, 2, 3 to lanes 7, 8, 9). These observations suggested that the autophagic status might depend on Caco-2 cell differentiation state. To confirm this hypothesis, the autophagosome number was measured in undifferentiated and differentiated cells using LC3 dots counting by immunofluorescence and confocal microscopy. As shown on **Figure 2**, differentiated cells showed more autophagosomes (compare mock control (CTRL) conditions in **Figure 2A** and **Figure 2B**). These experiments were quantified and indicated that differentiated cells displayed approximately 3-times more autophagosomes as compared to undifferentiated cells (**Figure 2C**). In addition, our results indicated that both undifferentiated and differentiated cells were responsive to rapamycin and chloroquine (CQ) treatments (**Figure 2**, mock conditions), as expected for authentic autophagosomes. An increased number of autophagosomes in differentiated cells might result from an increased initiation of autophagy and/or from a blockade of the autophagic flux. This was investigated by measuring the quantity of the lipidated form of LC3, LC3-II, in the presence or absence of chloroquine. We found that, in undifferentiated cells, chloroquine was still able to accumulate LC3-II (**Figure 3A**, compare lanes 1, 2, 3 to lanes 7, 8, 9) whereas, in differentiated cells, chloroquine allows only a very faint LC3-II accumulation, (**Figure 3B**, compare lanes 1, 2, 3 to lanes 7, 8, 9). Since LC3-II is degraded when delivered to lysosomes, the additional LC3-II quantity that accumulates in the presence of chloroquine reflects the amount of LC3-II that

would have been degraded if chloroquine had not been added. From this we derived a calculated value, named Δ LC3-II that, although relative and not fully quantitative, represents a realistic estimation of the autophagic flux. As shown in **Figure 3D**, undifferentiated mock Caco-2 cells displayed a Δ LC3-II value above 2, meaning that they should have a significant autophagic flux, whereas in mock differentiated cells this value was around 1, corresponding to an almost absent autophagic flux, at least during the 1h duration of chloroquine treatment. Altogether these data indicated that differentiated Caco-2 cells express higher levels of some major ATG proteins involved in autophagy initiation and showed a decreased autophagic flux, leading to autophagosomes accumulation. This was considered in the following as the basal autophagic status of Caco-2 cells.

Rotavirus infection does not change autophagic markers expression but perturbs the induction of autophagy initiation and fusion steps in Caco-2 cells.

Given this clarified context, we next determined if rotavirus infection might modulate autophagy in undifferentiated *versus* differentiated Caco-2 cells. It has already been shown that rotavirus infection didn't interfere with the differentiation process ⁵. In addition, it is important to note that the rotavirus cycle in both undifferentiated and differentiated Caco-2 cells was non lytic whereas this cycle is lytic in MA104 cells (**Figure 1D**). Cells were infected or not with the RF strain of rotavirus at MOI=10 and the expression of autophagic markers was analyzed. As shown in **Figure 1C**, rotavirus infection didn't affect the expression of the autophagic markers studied (compare lanes 1, 2, 3 with lanes 4, 5, 6 and lanes 7, 8, 9 with lanes 10, 11, 12). The expression level of LC3 was also unchanged in both undifferentiated and differentiated infected cells (**Figure 1E**). Accordingly, we found that the number of LC3 dots did not change in infected, as compared to mock-infected cells (compare mock and RV control conditions in **Figure 2A, 2B and 2C**). Interestingly, we observed that both rapamycin and chloroquine, alone or in combination, were unable to increase the dot number (**Figure 2**), suggesting that rotavirus infection did not affect the basal autophagic level of Caco-2 cells but interfered with the induction of both the initiation and fusion steps of autophagy.

More surprisingly, we also found that rotavirus infection induced a strong increase in LC3 lipidation only in undifferentiated cells, mostly at 16 and 24 hpi, which corresponded to the intermediate and late stages of RV morphogenesis in Caco-2 cells (**Figure 3A**, compare lanes 1, 2, 3 to lanes 4, 5, 6 **and Figure 3C**). Analysis of Δ LC3-II values (see above) showed that the autophagic flux in undifferentiated infected cells was comparable to control cells at 8 hpi,

while it was significantly reduced at 16 and 24 hpi (**Figure 3A**, lanes 4, 5, 6 compared to lanes 10, 11, 12 and **Figure 3D**), suggesting that at these later times, rotavirus infection blocked the autophagosome-lysosome fusion step. The above-described changes were almost absent in differentiated cells, where LC3 lipidation only faintly increased upon infection (**Figure 3B**, compare lanes 1, 2, 3 to lanes 4, 5, 6 and **Figure 3C**) and no significant change in the autophagic flux was detectable in these differentiated cells (**Figure 3D**).

To complete the study on relationships between rotavirus infection and autophagy we analyzed the putative interactions between autophagosomes and viral proteins, using immunofluorescence and confocal microscopy. Undifferentiated and differentiated Caco-2 cells were infected with rotavirus RF strain (MOI=10) and analyzed at 12 hpi, when rotavirus morphogenesis starts in these cells. We used five antibodies directed against viral proteins (VP2, VP4, VP7, NSP4 and NSP5) and 2G4, an antibody that only recognizes VP4 on assembled viruses. Interestingly, none of the antibodies tested displayed a significant colocalization with LC3 dots (**Figure 4**), suggesting that neither viral proteins nor assembled neo-virions interacted with autophagosomes. Altogether these results suggested that rotavirus infection (i) didn't apparently modify the steady state of basal autophagy in both undifferentiated and differentiated cells, (ii) interfered with both the autophagy initiation and fusion steps in both conditions (iii) specifically increased LC3 lipidation in undifferentiated cells and (iv) didn't promote interactions between rotavirus and autophagosomes.

Modulating autophagy did not affect rotavirus morphogenesis in both undifferentiated and differentiated Caco-2 cells

We next investigated whether modulating autophagy with either rapamycin alone or in combination with chloroquine was able to interfere with rotavirus production in undifferentiated and differentiated Caco-2 cells. Both chloroquine 50 μ M and rapamycin 10 μ M were added at 1 hpi, in order not to interfere with rotavirus entry, and maintained for the whole infection period. Viral progenies released in the medium at 12 and 24 hpi were quantified by plaque assay. First we noticed that untreated differentiated cells produced up to 100 times more virus than undifferentiated cells (**Figure 5A and 5B**). We then found that increasing autophagy initiation (+ rapamycin) with or without blocking the autophagic flux (addition of chloroquine or not) did not increase but rather tended to reduce rotavirus production in undifferentiated and, more clearly, in differentiated cells. Taken together, these results suggested that the autophagic process seemed to be disconnected from viral morphogenesis, since rotavirus infection did not perturb autophagic markers and autophagy

modulation did not affect virus production. However, it remains that we observed an increased LC3 lipidation in undifferentiated cells that must be explained. Such an increase might, at least partly, result from a decreased autophagic flux but might also be the consequence of increased autophagy-related lipidation mechanisms. Study of the mechanisms of LC3 lipidation was therefore undertaken in undifferentiated and differentiating Caco-2 cells, using siRNA strategies targeted towards the two canonical autophagy initiation complexes, namely ULK1/2 and PI3Kinase²⁶.

Both the ULK1/2 and the PI3K complexes are dispensable for viral-induced LC3 lipidation that correlate with an atypical form of ATG3.

To reduce LC3 lipidation that depends on canonical autophagic pathways, we targeted the ULK1/2 complex by siRNAs directed against ATG13 (siATG13), and the PI3K complex by siRNAs directed against Beclin-1 (siBECN1). We first determine the effects of these siRNAs in silencing the targeted protein at 24h, 48h and 72h post-transfection. One of the difficulties of this study was that, during transfection, cells continue to grow, becoming confluent at day 3 post-seeding (differentiating cells, see **figure 1A**), and start to polarize and to change their autophagic status (see above). This was clearly visible in cells transfected with irrelevant siRNA (siIRR), where we observed an increased expression of ATG13 and, to a lesser extent, of BECN1, as well as an increased level of LC3 lipidation from 24h to 72h post-transfection (**Figures 6A and 6B**, untreated siIRR conditions). Accordingly, the Δ LC3-II value tended to decrease from 24h to 72h post-transfection (**Figure 6C**), confirming that the autophagic flux decreased as the differentiation process takes place. Extinction of BECN1 and ATG13 was efficient as soon as 24h post-transfection (72% and 60% respectively) (**Figures 6A and 6B**), with increased extinction efficiency until 72h post-transfection (92% and 70%, respectively). Despite reduced amount of Beclin-1 or ATG13, the LC3-II level did not decrease at any time post-transfection compared to siIRR-transfected cells. This might be explained either by the fact that LC3 lipidation did not depend on these canonical pathways and/or by a reduced autophagic flux. To clarify this point, similar experiments were carried out in the presence of chloroquine. Interestingly, this resulted in a decreased accumulation of LC3-II (compare lanes siIRR to lanes siBECN1 or siATG13 in the presence of chloroquine), meaning that the lipidation of new molecules of LC3 was decreased in cells where BECN1 or ATG13 were diminished, thus indicating that siRNAs were rather efficient and that, in these cells, LC3 lipidation depended on canonical autophagy.

We next determined the effect of RV infection on LC3 lipidation in Caco-2 cells transfected with siBECN1 or siATG13 and infected at 24h post-transfection. We observed that, even in the presence of siBECN1 or siATG13, rotavirus-infected cells at 24 hpi still showed the same level of LC3-II than in infected but non-transfected or siIRR-transfected cells (**Figure 6D**), indicating that infection-induced LC3 lipidation proceeded through a mechanism independent of canonical autophagy. Since the level of ATG4B, ATG7, ATG5-ATG12 and ATG16L was unaffected by rotavirus infection (see **Figure 1C**), we explored the fate of ATG3, the protein directly in charge of transferring LC3 on phosphatidylethanolamine. As for most of the markers of autophagy initiation tested here, we observed an increased expression in differentiated, as compared to undifferentiated cells, which was not modified by rotavirus infection (**Figures 7A and 7B**). Interestingly however, we found that ATG3 appeared to be cleaved in infected undifferentiated cells from its full length size (37kDa) to a shorter one (35 kDa), as a function of the time post-infection (**Figure 7C**), in a way that paralleled the increased lipidation of LC3 in these cells (see **Figure 3A**).

Viral-induced LC3 lipidation is not required for rotavirus morphogenesis

We finally investigated whether virus-induced LC3 lipidation was required for rotavirus morphogenesis. Since targeting Beclin-1 or ATG13 did not affect virus-related LC3 lipidation (**Figure 6D**), the easiest way to reduce the amount of lipidated LC3-II was to directly silence LC3 by siRNA. We targeted the LC3B isoform since its role in autophagy is the best defined among members of the LC3 gene family. As shown in **Figure 8A**, cells transfected with a siRNA directed against LC3B (siLC3B) expressed only 28% of residual LC3 at 48h post-transfection. Caco-2 cells were transfected with siLC3B, siBECN1 or siATG13, infected with rotavirus at 24h post-transfection, and viruses released in the medium at 24 hpi were quantified by plaque assay. Silencing Beclin-1 or ATG13 did not have any significant impact on viral production. Silencing of LC3B resulted in a small but significant increase of virus production (**Figure 8**). Altogether our results indicated that neither autophagy, nor LC3 lipidation nor even LC3 expression played a role in rotavirus production in Caco-2 cells.

DISCUSSION

In this work, we analyzed the relationships between autophagy and rotavirus infection in Caco-2 cells that represent a realistic model of intestinal cells, the natural target of this virus. We first studied the basal autophagic status and demonstrated that it strongly depends

on the differentiation state of these cells. We next examined the effect of rotavirus infection on autophagy and showed that the basal autophagic status was unaffected by rotavirus infection, but that rotavirus was able to block both the initiation and fusion steps of autophagy. In addition we observed that rotavirus was able to induce LC3 lipidation, exclusively in undifferentiated cells, through a mechanism that does not relate to canonical autophagy.

The fact that autophagy may depend on the differentiation state of intestinal cells has been studied since a long time. Others and we demonstrated that undifferentiated HT-29 and Caco-2 cells displayed higher degradative capacities, as compared to differentiated cells⁴⁵⁻⁴⁷. More recently it was shown that autophagy was active in a model of normal colon cells, and in colon cancer cell lines⁴⁸, in good agreement with previous studies performed on human samples of gastrointestinal cancers⁴⁹. These data suggested that autophagy might be down regulated in differentiated cells. Our present data, on the contrary, indicated that several of the autophagic markers tested here were overexpressed at mRNA or protein levels. To reconcile these results, we propose that the profound decrease of the autophagic flux, observed here in differentiated cells, may by itself explain most of the previously observed decrease of degradative properties. Whether overexpression of ATG proteins involved in basal autophagy initiation may play a role in the differentiation process remains to be studied, since it appears that autophagy proteins may be involved in several autophagy-independent cellular processes⁵⁰. Notably, involvement of autophagy proteins in secretory processes²⁵ may indeed represent an interesting feature for differentiated cells and this may be related to the former observation that cell surface proteins of epithelial intestinal cells may accumulate in autophagic-like structure when their glucose metabolism is perturbed^{51,52}.

The global effect of rotavirus infection on autophagy in intestinal Caco-2 cells appears as rather complex. Apparently, rotavirus do not induce any modification of the autophagic markers expression at any differentiation stage, as well as no change in the number of autophagosomes. However this apparent steady state corresponds actually to two major processes: (i) a decreased autophagy initiation and (ii) an increased autophagic flux, as shown by the absence of effect of rapamycin and chloroquine on the number of autophagosomes. This means that, early after its entry into Caco-2 cells, rotavirus represses the autophagic process. Such a strategy, developed to avoid virus autophagic degradation by xenophagy⁵³, has been already described for several viruses. For example the Env protein of VIH-1 has been shown to activate mTORC1 in infected dendritic cells³². Several viruses from the *Herpesviridae* family encode viral proteins that directly interact with Beclin-1 and prevent its

association with hVPS34, a PI3 kinase required to initiate autophagy. Herpes virus gamma encodes a FLICE-like inhibitor protein (v-FLIP) that blocks phagophore elongation by inhibiting LC3-ATG3 binding ³⁵. The molecular mechanisms by which rotavirus may interfere with both autophagic initiation and fusion steps remain to be described, but our results argue for indirect interactions, since the expression level of autophagic markers is not modified and since we do not find colocalization between autophagosomes and viral proteins. Our conclusion is in line with a previous work that indicated that, in MA104 cells, virus infection does not correlate with an increased formation of autophagosomes, as detected by immunofluorescence and electron microscopy ²². In contrast, our results do not fit with those of a former work that proposed that in MA104 cells rotavirus hijacks autophagy through a calcium-dependent activation of CaMKK- β ²¹. We think that this discrepancy is mainly due to the fact that rotavirus morphogenesis strongly differs between Caco-2 and MA104 cells, where the virus cycle is non-lytic or lytic, respectively. In addition, it is interesting to note that in the study of Crawford and colleagues, there was no quantification of the amount of autophagosomes or of the autophagic flux in rotavirus-infected and mock-infected cells, thus preventing a complete analysis of autophagy modulation by rotavirus. Our results also indicate that induction of autophagy initiation and/or blockade of autophagosome fusion with lysosomes, using rapamycin and/or chloroquine, tends to decrease rotavirus production. From our point of view this observation reinforces the idea that autophagy cannot be exploited by the virus for its morphogenesis, but rather may serve as a cellular tool to control or limit virus production. Accordingly, partial silencing of LC3 resulted in a small but significant increase of virus production, indicating that autophagy may be detrimental for the virus. This may be linked to a well-known property of autophagy to deliver viral determinants to endosomal receptors that will elicit an anti-viral interferon response ⁵⁴, which is known to be critical for rotavirus infectivity ⁵⁵. The fact that differentiated Caco-2 cells are able to produce up to 100 times more neo-virions, as compared to undifferentiated cells, in a context where the autophagic flux is strongly reduced provides an additional argument for an anti-viral role of autophagy in Caco-2 cells.

We show here that, despite the above-described disconnection between rotavirus morphogenesis and autophagy, infected undifferentiated Caco-2 cells display a higher level of LC3-II, in good agreement with the previous observations of Arnoldi and colleagues ²². This may be due to the severe reduction of the autophagic flux and/or to changes in LC3 lipidation capacities in these cells. Using siRNAs directed against the two canonical autophagy initiation complexes, namely ULK1/2 or PI3K ²⁶, we have shown that these complexes do

function correctly in Caco-2 cells, but were surprisingly not involved in the rotavirus-induced increase of LC3 lipidation, indicating that this lipidation may depend on an autophagy-independent process. We cannot rule out the possibility that, even if strongly reduced, the residual amount of Beclin-1 or ATG13 could still support viral-induced LC3 lipidation. However, our results support the fact that siRNAs efficiently suppressed LC3 lipidation in undifferentiated mock-infected cells.

The transfer of LC3 on phosphatidyl-ethanolamine in biological membrane depends on a double ubiquitin-like system that involves ATG4B, ATG7, ATG10, ATG3 and the ATG5-ATG12-ATG16L1 complex⁵⁶. Our results indicate that the level of expression of all these ATG proteins (except ATG10 that was not studied) do not change upon rotavirus infection. Strikingly, we discover here that this increased LC3 lipidation correlates with the formation of still undescribed cleavage products of ATG3 that appeared as a function of the time post-infection. It has been recently demonstrated that Caspase 8 is able to cleave ATG3, providing an additional link between autophagy and apoptosis⁵⁷. However this do not seem to correspond to the here-described rotavirus-induced ATG3 cleavage. Indeed we observed here that ATG3 cleavage is not associated with autophagy modulation but correlate with an increased autophagy-independent LC3 lipidation. Interestingly, it has been recently shown that ATG3 is a membrane curvature-sensing protein that may play a major role in the spatial restriction of LC3 towards phagophores⁵⁸. These authors demonstrated that ATG3 activity requires an amino-terminal amphipathic helix similar to motifs found on proteins targeting highly curved intracellular membranes. It is tempting to speculate that the cleaved form of ATG3 may be responsible of an ectopic LC3 lipidation that may contribute to reduce canonical autophagy induction.

The present work was designed to better understand the cellular mechanisms that may support rotavirus assembly and trafficking in intestinal cells, with the idea that autophagy or the autophagic machinery may be part of the answer, as suggested earlier²¹. Our results clearly indicate that, in our cell system, rotavirus infection did not perturb autophagic markers and conversely that autophagy modulation did not affect virus production. This led us to the conclusion that neither autophagy, nor LC3 lipidation nor even LC3 expression played a role in rotavirus production in Caco-2 cells. We also show that autophagosomes do not colocalize with any of the viral proteins tested or with VP4-bearing viral particles. If autophagy doesn't play a role as membrane provider for rotavirus trafficking, it remains to find the pathway that carries viral proteins and viral particles from the ER to the apical plasma membrane. Whether an ectopic lipidation of LC3 may be involved is currently under investigation.

MATERIALS AND METHODS

Cells and culture conditions

Human colon adenocarcinoma Caco-2 cells (passages 70 to 90) were cultured as previously described ⁴, in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 4,5g/L glucose, 4 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FCS), 1% penicillin-streptomycin and 1% nonessential amino acids (all reagents were purchased from Life Technologies, Saint-Aubin, France), at 37°C, in a 5% CO₂ humid atmosphere. For experiments, cells were seeded at a density of 75,000 cells per cm² on plastic tissue culture plates so that they would be approximately 60% confluent the next day. Cells used for experiments at 1 day post-seeding were in an undifferentiated state. For differentiation, Caco-2 cells were cultured for 20 days post-seeding (18 days after having reached 100% confluency), with media changed everyday. Antibiotics were removed from media starting from day 10 post-seeding.

African green monkey kidney epithelial MA104 cells, used for virus titration and LDH measurements, were cultured in DMEM supplemented with 4.5 g/L glucose, 4 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10% heat-inactivated FCS and 1% penicillin-streptomycin.

LDH measurements

The lactate deshydrogenase (LDH) activity in the culture medium and in the cell lysate was assayed by measuring the decreased in absorbance at 340 nm resulting from the oxidation of NADH (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cytotoxicity was calculated as follow: $\text{Cytotoxicity} = \text{LDH activity}_{\text{medium}} * 100 / (\text{LDH activity}_{\text{medium}} + \text{LDH activity}_{\text{lysate}})$.

Cell lysis was considered to occur when cytotoxicity exceeded 10%.

Virus and infection

The RF strain of rotavirus was obtained from J. Cohen (CNRS, Gif sur Yvette, France). Before infection, viruses were treated with 0,5 µg/ml trypsin (Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature and Caco-2 cells were washed three times with DMEM. Infection was carried out at the MOI of 10 PFU/cell. Viruses were left to adsorb on cells for 1 h at 37°C, in DMEM containing 0,5 µg/ml trypsin. Unless indicated otherwise, cells were only FCS-deprived during the period of virus adsorption. After removal of the viral inoculum, cells were

washed twice with DMEM and maintained in complete antibiotic-free culture medium for the indicated time post-infection.

Chemicals

Rapamycin (Sigma-Aldrich) was used at 10 μ M starting 1h post-infection for all the time in culture and Chloroquine (Sigma-Aldrich) was used at 50 μ M during the last hour before analysis. In virus production experiments, both drugs were added at 1 hpi (after the virus adsorption period) and maintained until virus collection.

SDS-PAGE and Western Blot

For protein extract preparation, cells were rinsed once with ice-cold Phosphate Buffered Saline and lysed in 10 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer containing 1% Triton, 150 mM NaCl, 5 mM NaF, 1mM Na₃VO₄ and EDTA-containing protein inhibitor tablet (Roche, Boulogne-Billancourt, France). Cell lysates were sonicated for 20 sec and centrifuged at 6000 x g for 15 min at 4°C to get rid of cellular debris. An adequate volume of 5X Laemmli buffer (31.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 1% SDS, 5% β -mercaptoethanol and 0.005% Bromophenol Blue at final concentration) was added to supernatants, which were subsequently boiled at 95°C for 5 min. Thirty μ g of protein for each sample was loaded on 4-15% SDS-PAGE (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France). Membranes were incubated with the following antibodies: anti-LKB1 mouse monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-LC3B rabbit polyclonal antibody (Sigma-Aldrich), anti-Beclin-1 rabbit polyclonal antibody (Novus Biologicals, Cambridge, UK), anti-ATG13 rabbit polyclonal antibody, anti-ATG5 rabbit polyclonal antibody, anti-actin rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), anti-ATG4B mouse monoclonal antibody, anti-ATG16L1 mouse monoclonal antibody, anti-ATG7 rabbit polyclonal antibody (MBL International Corporation, Clinisciences, Nanterre, France) and HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Sigma-Aldrich). Signals were detected using ECL reagent (GE Healthcare Life Sciences).

Confocal microscopy and image analysis

Cells were either fixed for 10 min in 2% paraformaldehyde, permeabilized with 0,075% saponin. Antibodies used for immunofluorescence (IF) were as follow: anti-LC3B rabbit

polyclonal antibody (Cell Signaling Technology); M60 anti-rotavirus VP7 mouse mAb ⁵⁹; RV138 anti-rotavirus VP6 mouse mAb ⁶⁰; 7.7 and 2G4 anti-rotavirus VP4 mouse mAb ; 164E22 anti-rotavirus VP2 mouse mAb ⁶¹; 158G37 anti-rotavirus NSP5 mouse mAb ⁶²; LA5 anti-rotavirus NSP2 mouse mAb ⁶³; 8148F anti-rotavirus RF rabbit polyclonal Ab (gift from Dr Jean Cohen, Gif sur Yvette, France); RF 925 anti-rotavirus RF goat polyclonal antibody; RF138 anti-rotavirus RF goat polyclonal antibody (gifts from René L'Haridon, INRA Jouy en Josas, France); anti-mouse Alexa Fluor 488 antibody (Molecular Probes, USA); anti-rabbit FITC-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch lab., USA); anti-mouse Cy3-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch lab.);, anti-rabbit Cy3-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch lab.);, anti-goat Alexa Fluor 647 antibody (Life Technologies); anti-rabbit Alexa Fluor 647 antibody (Life Technologies). IF images were captured obtained using either a Leica SP2 or a Leica SP5 confocal laser (Wetzlar, Germany). The 488 nm and the 543 nm wavelengths of argon ion lasers were used for with sequential excitation of Alexa Fluor 488, Cy3 and Alexa Fluor 647. The biphoton beamline (Chameleon, Coherent Inc., USA) was used at 750 nm to record the DAPI signal. Between 5 and 20 Z-stacks, each 0.2 μ m thick, were acquired, depending on the height of cells. Merged images were obtained by means of computer overlay of green, red and blue images using Leica Confocal Software and mounted using Image J and Photoshop CS4. Except otherwise stated, displayed is the median section of each series.

For dot counting, original slices, acquired by confocal microscopy, were directly transferred to Image J (FiJi, version 1.49J), converted in 8-bits black and white images, and the total number of dots in the field was counted (macro “count particles”) with settings allowing the detection of dot sizing 3 to 100 pixels. The number of cells in each field was given by the DAPI staining (not shown) and the number of dot per cell was obtained by dividing the total number of dots by the number of cells. At least 20 cells by condition were analyzed, corresponding to 4 or 5 fields. Image panels were mounted using Photoshop software (CS6, version 13.06).

Transient transfection

Cells were seeded at a density of 75,000 cells per cm^2 on plastic tissue culture plates (300,000 cells per well in a 12-well plate) and transfected with annealed duplex siRNAs at 1 day post-seeding, using Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies) as transfection reagent. The quantity of transfection reagent was adjusted according to the quantity of siRNA, following manufacturer's instructions. siRNA directed against eGFP (Sigma-Aldrich) was used as

control (referred to as siIRR). siRNAs directed against Beclin-1 (Eurogentec, Angers, France), FIP200 (Qiagen, Courtaboeuf, France), ATG13 and LC3B (Cell Signaling Technology) were transfected at 25 nM, 25 nM, 100 nM and 100 nM, respectively. All were commercial pre-designed siRNAs, with the exception of the siRNA directed against Beclin-1 which has the following sequence: 5'-CAGUUUGGCACAAUCAUG-3'.

Viral production and titration

Culture media of infected cells were collected and centrifuged at 2000 rpm for 15 min at 4°C. Viruses contained in supernatants were collected and titrated by plaque assay on a monolayer of MA104 cells, as previously described ⁶⁴.

Statistical analyses

Statistical differences between groups were determined using two-tailed Student t test. P values of <0.05 were considered as significant.

REFERENCES

1. Guérin-Danan C, Meslin JC, Chambard A, Charpilienne A, Relano P, Bouley C, Cohen J, Andrieux C. Food supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* DN-114 001 protects suckling rats from rotavirus-associated diarrhea. *J Nutr* 2001; 131:111–7.
2. Boshuizen JA, Reimerink JHJ, Korteland-van Male AM, van Ham VJJ, Bouma J, Gerwig GJ, Koopmans MPG, Büller HA, Dekker J, Einerhand AWC. Homeostasis and function of goblet cells during rotavirus infection in mice. *Virology* 2005; 337:210–21.
3. Crawford SE, Patel DG, Cheng E, Berkova Z, Hyser JM, Ciarlet M, Finegold MJ, Conner ME, Estes MK. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. *J Virol* 2006; 80:4820–32.
4. Zweibaum A, Triadou N, Kedinger M, Augeron C, Robine-Léon S, Pinto M, Rousset M, Haffen K. Sucrase-isomaltase: a marker of foetal and malignant epithelial cells of the human colon. *Int J Cancer J Int Cancer* 1983; 32:407–12.
5. Jourdan N, Maurice M, Delautier D, Quero AM, Servin AL, Trugnan G. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J Virol* 1997; 71:8268–78.
6. Svensson L, Finlay BB, Bass D, Bonsdorff CH von, Greenberg HB. Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Virol* 1991; 65:4190.
7. Foulke-Abel J, In J, Kovbasnjuk O, Zachos NC, Ettayebi K, Blutt SE, Hyser JM, Zeng X-L, Crawford SE, Broughman JR, et al. Human enteroids as an ex-vivo model of host-pathogen interactions in the gastrointestinal tract. *Exp Biol Med* Maywood NJ 2014; 239:1124–34.

8. Sapin C, Colard O, Delmas O, Tessier C, Breton M, Enouf V, Chwetzoff S, Ouanich J, Cohen J, Wolf C, et al. Rafts Promote Assembly and Atypical Targeting of a Nonenveloped Virus, Rotavirus, in Caco-2 Cells. *J Virol* 2002; 76:4591–602.
9. Delmas O, Durand-Schneider A-M, Cohen J, Colard O, Trugnan G. Spike Protein VP4 Assembly with Maturing Rotavirus Requires a Postendoplasmic Reticulum Event in Polarized Caco-2 Cells. *J Virol* 2004; 78:10987–94.
10. Halasz P, Holloway G, Coulson BS. Death mechanisms in epithelial cells following rotavirus infection, exposure to inactivated rotavirus or genome transfection. *J Gen Virol* 2010; 91:2007–18.
11. Gardet A, Breton M, Trugnan G, Chwetzoff S. Role for actin in the polarized release of rotavirus. *J Virol* 2007; 81:4892–4.
12. Cuadras MA, Greenberg HB. Rotavirus infectious particles use lipid rafts during replication for transport to the cell surface in vitro and in vivo. *Virology* 2003; 313:308–21.
13. Chua CEL, Lim YS, Lee MG, Tang BL. Non-classical membrane trafficking processes galore. *J Cell Physiol* 2012; 227:3722–30.
14. Schotman H, Karhinen L, Rabouille C. dGRASP-Mediated Noncanonical Integrin Secretion Is Required for Drosophila Epithelial Remodeling. *Dev Cell* 2008; 14:171–82.
15. Gee HY, Noh SH, Tang BL, Kim KH, Lee MG. Rescue of $\Delta F508$ -CFTR Trafficking via a GRASP-Dependent Unconventional Secretion Pathway. *Cell* 2011; 146:746–60.
16. Trask SD, McDonald SM, Patton JT. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10:165–77.
17. Musalem C, Espejo RT. Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11. *J Gen Virol* 1985; 66 (Pt 12):2715–24.
18. Pérez JF, Chemello ME, Liprandi F, Ruiz MC, Michelangeli F. Oncosis in MA104 cells is induced by rotavirus infection through an increase in intracellular Ca^{2+} concentration. *Virology* 1998; 252:17–27.
19. Zambrano JL, Ettayebi K, Maaty WS, Faunce NR, Bothner B, Hardy ME. Rotavirus infection activates the UPR but modulates its activity. *Virol J* 2011; 8:359.
20. Trujillo-Alonso V, Maruri-Avidal L, Arias CF, Lopez S. Rotavirus Infection Induces the Unfolded Protein Response of the Cell and Controls It through the Nonstructural Protein NSP3. *J Virol* 2011; 85:12594–604.
21. Crawford SE, Hyser JM, Utama B, Estes MK. Autophagy hijacked through viroporin-activated calcium/calmodulin-dependent kinase kinase- signaling is required for rotavirus replication. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109:E3405–13.
22. Arnoldi F, De Lorenzo G, Mano M, Schraner EM, Wild P, Eichwald C, Burrone OR. Rotavirus Increases Levels of Lipidated LC3 Supporting Accumulation of Infectious Progeny Virus without Inducing Autophagosome Formation. *PLoS ONE* 2014; 9:e95197.
23. Klionsky DJ, Codogno P. The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J Innate Immun* 2013; 5:427–33.
24. Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol* 2010; 12:823–30.
25. Deretic V, Jiang S, Dupont N. Autophagy intersections with conventional and unconventional secretion in tissue development, remodeling and inflammation. *Trends Cell Biol* 2012; 22:397–406.

26. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22:124–31.
27. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* 2004; 117:2805–12.
28. Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell* 2007; 130:165–78.
29. Samali A, FitzGerald U, Deegan S, Gupta S. Methods for Monitoring Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response. *Int J Cell Biol* 2010; 2010:1–11.
30. Díaz-Troya S, Pérez-Pérez ME, Florencio FJ, Crespo JL. The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* 2008; 4:851–65.
31. Levine B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 2005; 120:159–62.
32. Blanchet FP, Moris A, Nikolic DS, Lehmann M, Cardinaud S, Stalder R, Garcia E, Dinkins C, Leuba F, Wu L. Human Immunodeficiency Virus-1 Inhibition of Immunoamphisomes in Dendritic Cells Impairs Early Innate and Adaptive Immune Responses. *Immunity* 2010; 32:654–69.
33. Orvedahl A, Alexander D, Tallóczy Z, Sun Q, Wei Y, Zhang W, Burns D, Leib DA, Levine B. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* 2007; 1:23–35.
34. Sinha S, Colbert CL, Becker N, Wei Y, Levine B. Molecular basis of the regulation of Beclin 1-dependent autophagy by the gamma-herpesvirus 68 Bcl-2 homolog M11. *Autophagy* 2008; 4:989–97.
35. Lee J-S, Li Q, Lee J-Y, Lee S-H, Jeong JH, Lee H-R, Chang H, Zhou F-C, Gao S-J, Liang C, et al. FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat Cell Biol* 2009; 11:1355–62.
36. Wong J, Zhang J, Si X, Gao G, Mao I, McManus BM, Luo H. Autophagosome Supports Cocksackievirus B3 Replication in Host Cells. *J Virol* 2008; 82:9143–53.
37. Sir D, Chen W, Choi J, Wakita T, Yen TSB, Ou JJ. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology* 2008; 48:1054–61.
38. Li J, Liu Y, Wang Z, Liu K, Wang Y, Liu J, Ding H, Yuan Z. Subversion of Cellular Autophagy Machinery by Hepatitis B Virus for Viral Envelopment. *J Virol* 2011; 85:6319–33.
39. Jackson WT, Giddings TH, Taylor MP, Mulinyawe S, Rabinovitch M, Kopito RR, Kirkegaard K. Subversion of Cellular Autophagosomal Machinery by RNA Viruses. *PLoS Biol* 2005; 3:e156.
40. Netherton CL, Wileman T. Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. *Curr Opin Virol* 2011; 1:381–7.
41. Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 1988; 48:1936–42.
42. Le Bivic A, Quaroni A, Nichols B, Rodriguez-Boulán E. Biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2, a human intestinal epithelial cell line. *J Cell Biol* 1990; 111:1351–61.

43. Baas AF, Kuipers J, van der Wel NN, Batlle E, Koerten HK, Peters PJ, Clevers HC. Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell* 2004; 116:457–66.
44. Corradetti MN, Inoki K, Bardeesy N, DePinho RA, Guan K-L. Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev* 2004; 18:1533–8.
45. Trugnan G, Rousset M, Chantret I, Barbat A, Zweibaum A. The posttranslational processing of sucrase-isomaltase in HT-29 cells is a function of their state of enterocytic differentiation. *J Cell Biol* 1987; 104:1199–205.
46. Hourì JJ, Ogierdenis E, Trugnan G, Codogno P. Autophagic Degradation of N-Linked Glycoproteins Is Downregulated in Differentiated Human Colon Adenocarcinoma Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197:805–11.
47. Ogier-Denis E, Couvineau A, Maoret JJ, Hourì JJ, Bauvy C, Stefanis DD, Isidoro C, Laburthe M, Codogno P. A Heterotrimeric G-protein Controls Autophagic Sequestration in the Human Colon Cancer Cell Line HT-29. *J Biol Chem* 1995; 270:13–6.
48. Groulx J-F, Khalfaoui T, Benoit YD, Bernatchez G, Carrier JC, Basora N, Beaulieu J-F. Autophagy is active in normal colon mucosa. *Autophagy* 2012; 8:893–902.
49. Sato K, Tsuchihara K, Fujii S, Sugiyama M, Goya T, Atomi Y, Ueno T, Ochiai A, Esumi H. Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Res* 2007; 67:9677–84.
50. Subramani S, Malhotra V. Non-autophagic roles of autophagy-related proteins. *EMBO Rep* 2013; 14:143–51.
51. Rousset M, Laburthe M, Pinto M, Chevalier G, Rouyer-Fessard C, Dussaulx E, Trugnan G, Boige N, Brun JL, Zweibaum A. Enterocytic differentiation and glucose utilization in the human colon tumor cell line Caco-2: modulation by forskolin. *J Cell Physiol* 1985; 123:377–85.
52. Baricault L, Garcia M, Cibert C, Sapin C, Geraud G, Codogno P, Trugnan G. Forskolin blocks the apical expression of dipeptidyl peptidase IV in Caco-2 cells and induces its retention in lamp-1-containing vesicles. *Exp Cell Res* 1993; 209:277–87.
53. Levine B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 2005; 120:159–62.
54. Jordan TX, Randall G. Manipulation or capitulation: virus interactions with autophagy. *Microbes Infect* 2012; 14:126–39.
55. Arnold MM, Sen A, Greenberg HB, Patton JT. The battle between rotavirus and its host for control of the interferon signaling pathway. *PLoS Pathog* 2013; 9:e1003064.
56. Geng J, Klionsky DJ. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. “Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects” Review Series. *EMBO Rep* 2008; 9:859–64.
57. Oral O, Oz-Arslan D, Itah Z, Naghavi A, Deveci R, Karacali S, Gozuacik D. Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death. *Apoptosis Int J Program Cell Death* 2012; 17:810–20.
58. Nath S, Dancourt J, Shteyn V, Puente G, Fong WM, Nag S, Bewersdorf J, Yamamoto A, Antony B, Melia TJ. Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. *Nat Cell Biol* 2014; 16:415–24.
59. Mirazimi A, Svensson L. ATP is required for correct folding and disulfide bond formation of rotavirus VP7. *J Virol* 2000; 74:8048–52.

60. Kohli E, Maurice L, Bourgeois C, Bour JB, Pothier P. Epitope mapping of the major inner capsid protein of group A rotavirus using peptide synthesis. *Virology* 1993; 194:110–6.
61. Roseto A, Scherrer R, Cohen J, Guillemin MC, Charpilienne A, Feynerol C, Peries J. Isolation and characterization of anti-rotavirus immunoglobulins secreted by cloned hybridoma cell lines. *J Gen Virol* 1983; 64 (Pt 1):237–40.
62. Fabbretti E, Afrikanova I, Vascotto F, Burrone OR. Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J Gen Virol* 1999; 80:333–9.
63. Aponte C, Mattion NM, Estes MK, Charpilienne A, Cohen J. Expression of two bovine rotavirus non-structural proteins (NSP2, NSP3) in the baculovirus system and production of monoclonal antibodies directed against the expressed proteins. *Arch Virol* 1993; 133:85–95.
64. Estes MK, Graham DY. Identification of rotaviruses of different origins by the plaque-reduction test. *Am J Vet Res* 1980; 41:151–2.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Autophagic markers expression strongly depends on autophagy but not on rotavirus infection. (Panel A) Caco-2 cells differentiate as a function of the time in culture. Caco-2 cells were grown for 1-2 days, 3-4 days or 21 days and analyzed by immunofluorescence and confocal microscopy for 525 antigen (525 Ag), a basolateral marker and for saccharase-isomaltase (SI), an apical marker. Displayed are representative image of at least triplicate independent experiments. Bars represent 10 μ m. (Panel B) The mRNA level of LC3 was measured using qPCR in undifferentiated (U) or differentiated (D) Caco-2 cells. Results are means \pm SEM of triplicate independent experiments. (Panel C) The expression level of the major ATG proteins involved in autophagy initiation was measured by western blots. Undifferentiated (U, lanes 1-6) or differentiated (D, lanes 7-12) Caco-2 cells were mock infected (lanes 1, 2, 3 and 7, 8, 9) or rotavirus-infected (lanes 4, 5, 6 and 10, 11, 12) with the RF strain of rotavirus (MOI=10) for 8, 16 or 24 hours. After SDS-PAGE and transfer to PVDF membranes, membranes were probed using antibodies directed against LKB1, ATG4B, ATG7, ATG5/ATG12 and ATG16L1 and a monoclonal antibody against actin. Actin was used to normalize the amount of loaded protein. The gel presented is representative of duplicate independent experiments. (Panel D) Cell lysis was analyzed using the quantification of lactase dehydrogenase (LDH) released from mock or infected MA104 or Caco-2 cells. Results are means \pm SEM of triplicate experiments. (Panel E) The mRNA level of LC3 was analyzed as in B in mock or infected undifferentiated (U) or differentiated (D) Caco-2 cells. Results are means \pm SEM of triplicate independent experiments.

Figure 2. The number of autophagosomes varies as a function of cell differentiation but not rotavirus infection. (Panels A, B) Undifferentiated (U, panel A) or differentiated (D, panel B) Caco-2 cells, grown on glass coverslips, were mock infected (Mock) or RV-infected with the RF strain of rotavirus (RF) (MOI=10) for 12 hours. After fixation and permeabilization, cells were stained with a polyclonal antibody raised against LC3. Cells were treated either with DMSO (CTRL, control conditions), or 10 μ M rapamycin (RAPA), starting 1hpi until the end of the experiment, or 50 μ M chloroquine (CLQ), during the last hour of infection or with both drugs (RAPA+CLQ). Image displayed are representative of at least triplicate independent experiments. Bars represent 5 μ m. (Panel C) The number of dots per cell was quantified in all the conditions tested using Image J software, as described in the method section. At least 20 cells by condition were analyzed, corresponding to 4 or 5 fields. Results are means \pm SEM of duplicate independent experiments.

Figure 3. LC3 lipidation varies as a function of cell differentiation and rotavirus infection. (Panel A) Undifferentiated (U) Caco-2 cells were mock-infected (lanes 1, 2, 3 and 7, 8, 9) or RV-infected with the RF strain of rotavirus (MOI=10) (lanes 4, 5, 6 and 10, 11, 12) for 8, 16 or 24 hours and treated or not with 50 μ M chloroquine (CQ). After SDS-PAGE and transfer to PVDF membranes, membranes were probed using a polyclonal antibody directed against LC3 and a monoclonal antibody against actin. Actin was used to normalize the amount of protein loaded. The gel presented is representative of triplicate experiments. LC3 I: non-lipidated form; LC3-II: lipidated form. (Panel B) As in (A) for differentiated (D) Caco-2 cells. (Panel C) Quantification of the amount of LC3-II produced in rotavirus-infected cells compared to mock infected cells. Gels from Panels A and B were scanned and quantified, using Image J software. The relative amount of LC3-II was normalized to actin in both undifferentiated (panel A) and differentiated cells (panel B) and the ratio between infected (lanes 4, 5, 6) and mock infected cells (lanes 1, 2, 3) was calculated at each time post-infection. Results are means \pm SEM of triplicate independent experiments. (Panel D) Representation of autophagic flux intensity by the calculated Δ LC3-II value, which is the ratio of the LC3-II level accumulated in the presence of CQ normalized to the LC3-II level in the absence of this drug, derived from the gels displayed in panel A and B and those derived from triplicate experiments. The data correspond to the means \pm SEM and statistically analyzed using the two-tailed Student t-test: (a) $p > 0,1$ as compared to corresponding mock cells; (b) $p < 0,05$ as compared to corresponding mock cells; (c) $p < 0,01$ as compared to corresponding

mock cells; (d) $p < 0,05$ as compared to corresponding undifferentiated mock cells; (e) $p < 0,01$ as compared to corresponding mock cells; (f) $p > 0,1$ as compared to corresponding mock cells.

Figure 4. Rotavirus proteins do not colocalize with autophagosomes. Undifferentiated (U) or differentiated (D) Caco-2 cells, grown on glass coverslips, were infected with the RF strain of rotavirus (MOI=10) for 12 hours. After fixation and permeabilization, cells were stained with a polyclonal antibody raised against LC3 and either with monoclonal antibody raised against VP2, unassembled VP4 (7.7), particle-associated VP4 (2G4), VP7, NSP4 or NSP5, as indicated. Images were acquired sequentially for the FITC and Cy3 channel. Bars represent 5 μm . Displayed images are representative of at least duplicate independent experiments.

Figure 5. Increasing autophagy tends to decrease rotavirus production. Quantification by plaque assay of viruses released in the culture medium at 12 and 24 hpi of undifferentiated (panel A) or differentiated (panel B) Caco-2 cells, left untreated or treated with 10 μM Rapamycin (Rapa) alone or in combination with 50 μM Chloroquine (CQ). Chemical drugs were added at 1 hpi and maintained during all the infection time. Results are means \pm SEM of duplicate independent experiments.

Figure 6. Canonical autophagy functions in Caco-2 cells, but is not involved in rotavirus-induced LC3 lipidation. (Panels A, B) Differentiating Caco-2 cells were transfected with an irrelevant siRNA (siGFP, noted siIRR, 100 nM) or siRNAs directed against Beclin-1 (siBECN1, 25 nM) (panel A) or ATG13 (siATG13, 100 nM) (panel B), in the absence or presence of 50 μM Chloroquine (CQ) during the last hour before harvesting. Cellular extracts at 24, 48 and 72h post-transfection were analyzed by Western Blot, using antibodies raised against LC3 (panels A and B), Beclin-1 (panel A) or ATG 13 (panel B) and a monoclonal antibody against actin (panel A, B). The extinction efficiency was calculated by comparing band intensities in siBECN-1 or siATG13 lanes relative to the corresponding siIRR at each time post-transfection. The intensity of the LC3-II band (normalized to actin) is represented as fold increase compared to the LC3-II intensity in siIRR-transfected cells at 24h post-transfection. Displayed gels are representative of duplicate independent experiments. (Panel C) Representation of autophagic flux intensity as calculated by $\Delta\text{LC3-II}$ value. (Panel D) Differentiating Caco-2 cells were non-transfected (NT), transfected with siIRR or siBECN-1 or siATG13 and either mock infected or rotavirus infected at 24h post-transfection. At 24h

post-infection (48h post-transfection), cells were harvested and analyzed by Western blot using a polyclonal antibody raised against LC3 and a monoclonal antibody against actin. Displayed gel is representative of duplicate independent experiments.

Figure 7. Rotavirus infection promotes a specific cleavage of ATG3 in undifferentiated cells. (Panel A) Undifferentiated (U) or differentiated (D) Caco-2 cells were mock infected (Mock) or rotavirus-infected (RV) with the RF strain of rotavirus (MOI 10) for 8, 16 or 24 hours. Protein extracts were analyzed by Western blot using a polyclonal antibody directed against ATG3 and a monoclonal antibody against actin. Displayed gel is representative of triplicate independent experiments. A long exposure image of the gel is displayed to visualize the cleaved form of ATG3 (around 35 kDa). A short exposure time image is displayed to visualize the changes of ATG3 expression level as a function of the differentiation state. (Panel B) ATG3 (37 kDa) band intensities were quantified on gels from three independent experiments. Results are means \pm SEM of triplicate independent experiments. (Panel C) Band intensities of the two forms of ATG3 (37 kDa and 35 kDa) from undifferentiated Caco-2 cells were quantified on gels from three experiments. For each condition, the sum of intensities of the 37 kDa and 35 kDa bands is considered as 100%. Results are means \pm SEM of triplicate independent experiments.

Figure 8. siRNA against BECN-1, ATG13 or LC3 do not decrease rotavirus production. (Panel A) Differentiating Caco-2 cells were either transfected with siIRR or siLC3B for 24 or 48h. LC3 was measured by Western blot as described above. Actin was used to normalize the amount of loaded proteins. The displayed gel is representative of two independent experiments. (Panel B) Quantification by plaque assay of viruses released in the culture medium at 24 hpi of differentiating cells transfected for 48h either with siIRR, siBECN-1, siATG13 or siLC3. Results are means \pm SEM of triplicate independent experiments.

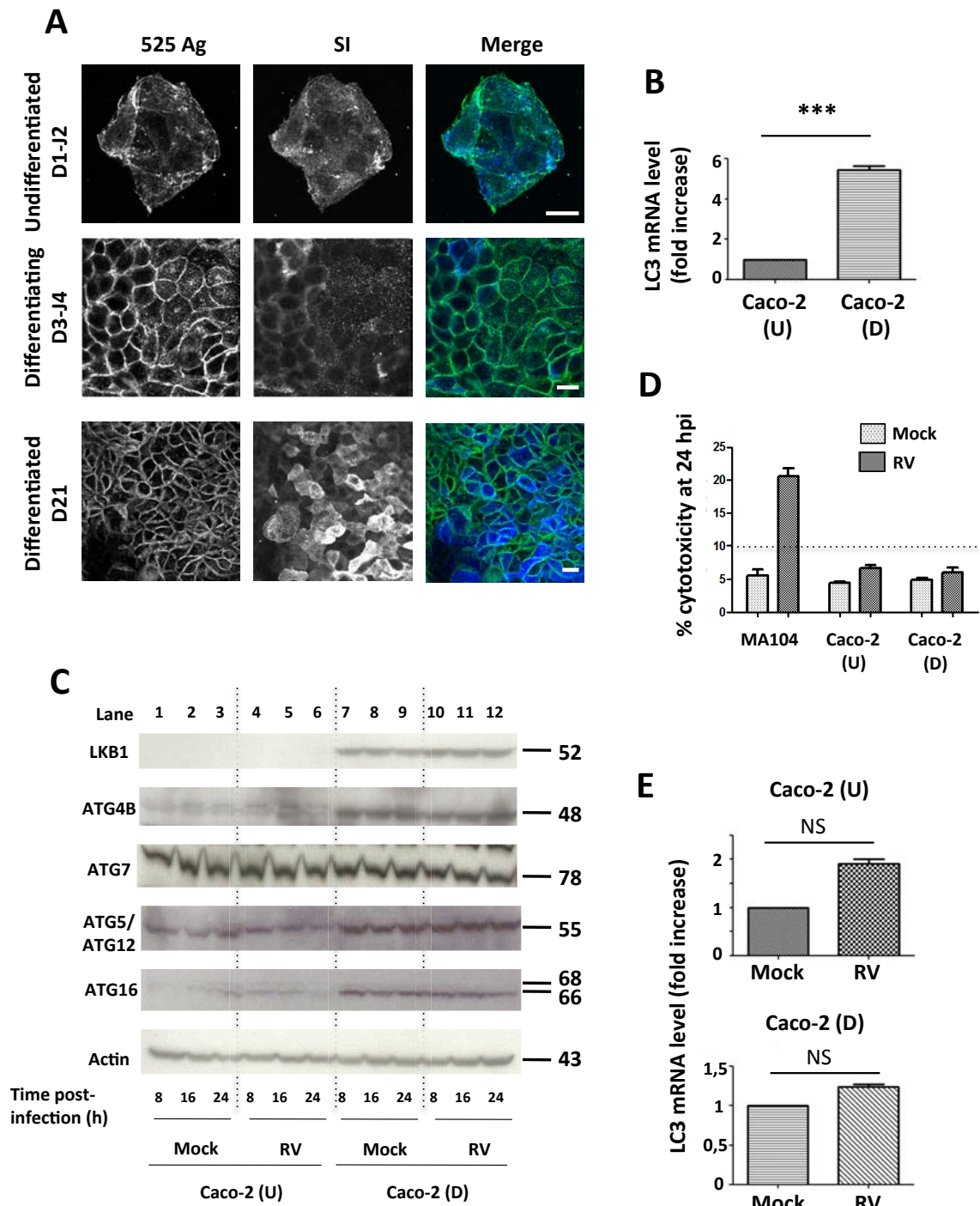


Figure 1

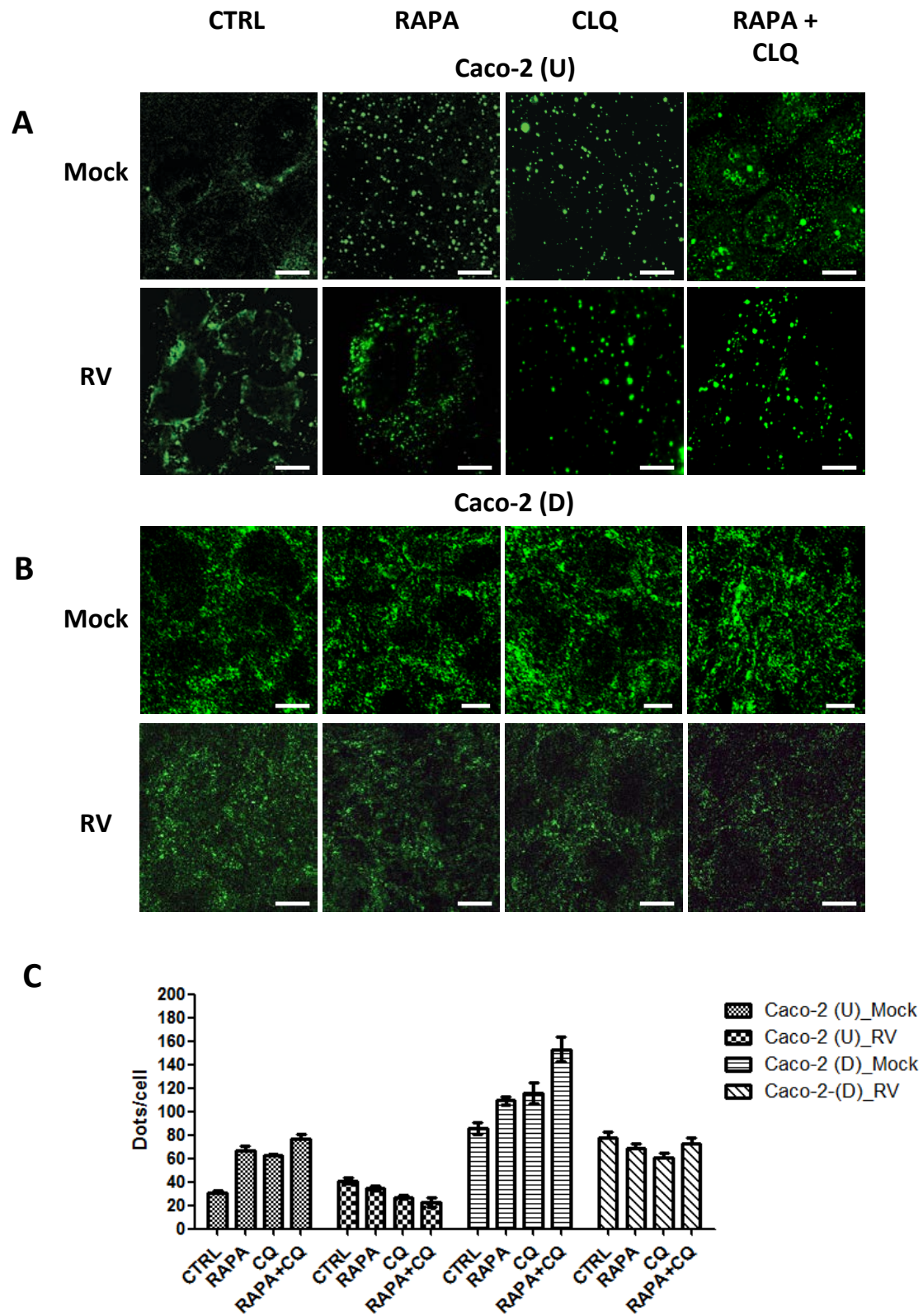


Figure 2

Figure 3

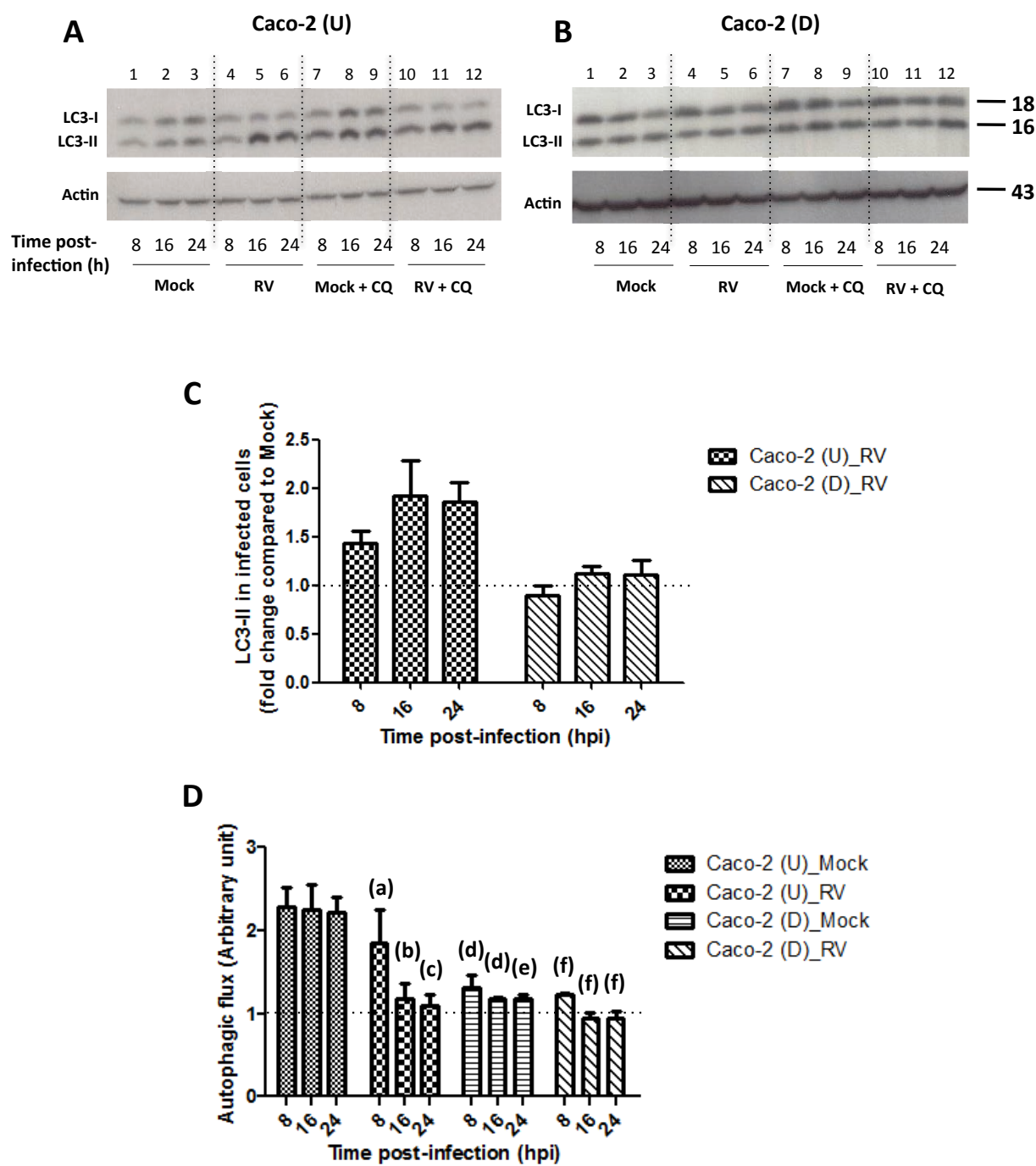
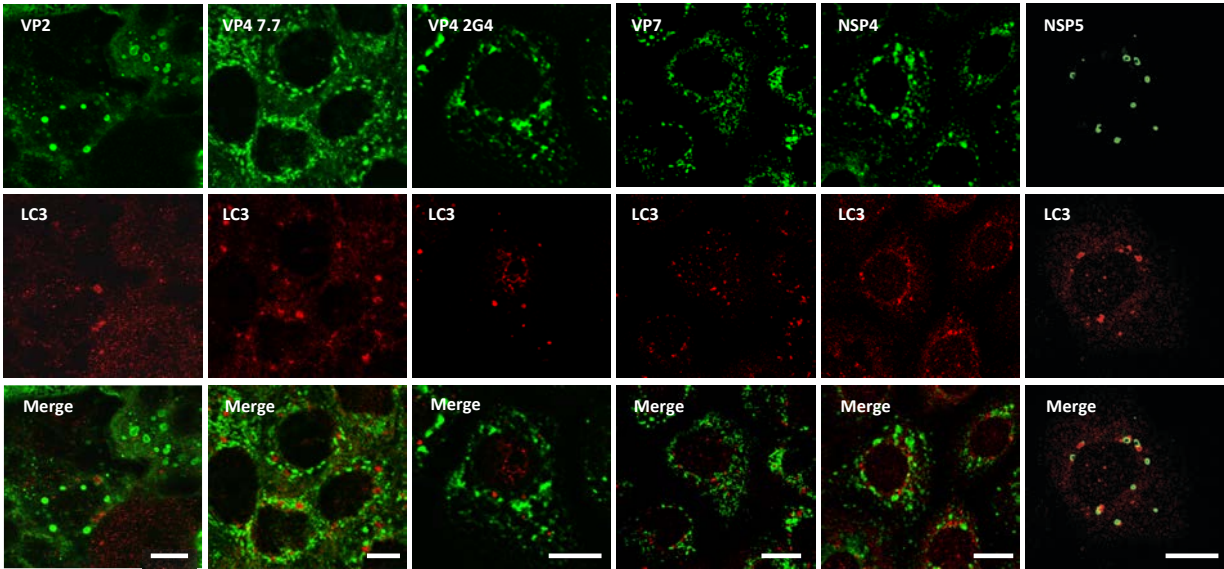


Figure 4

Caco-2 (U)



Caco-2 (D)

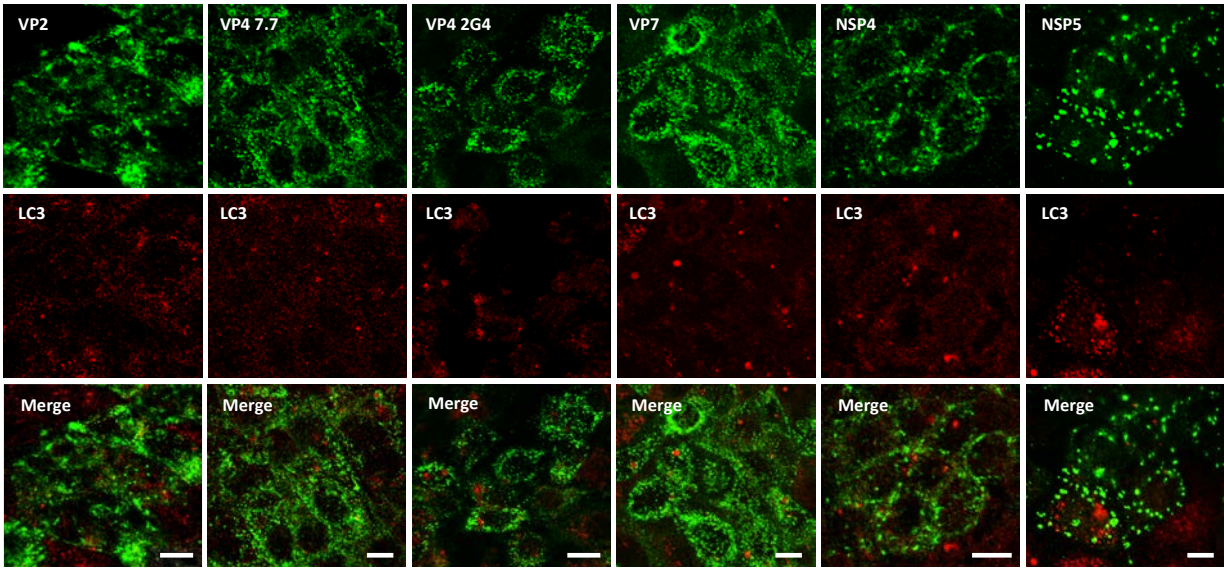


Figure 5

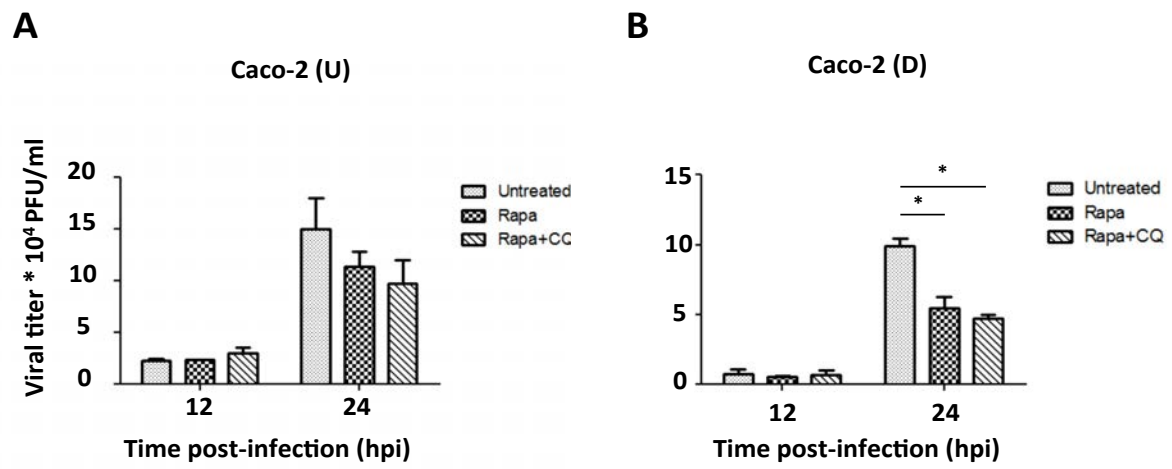


Figure 6

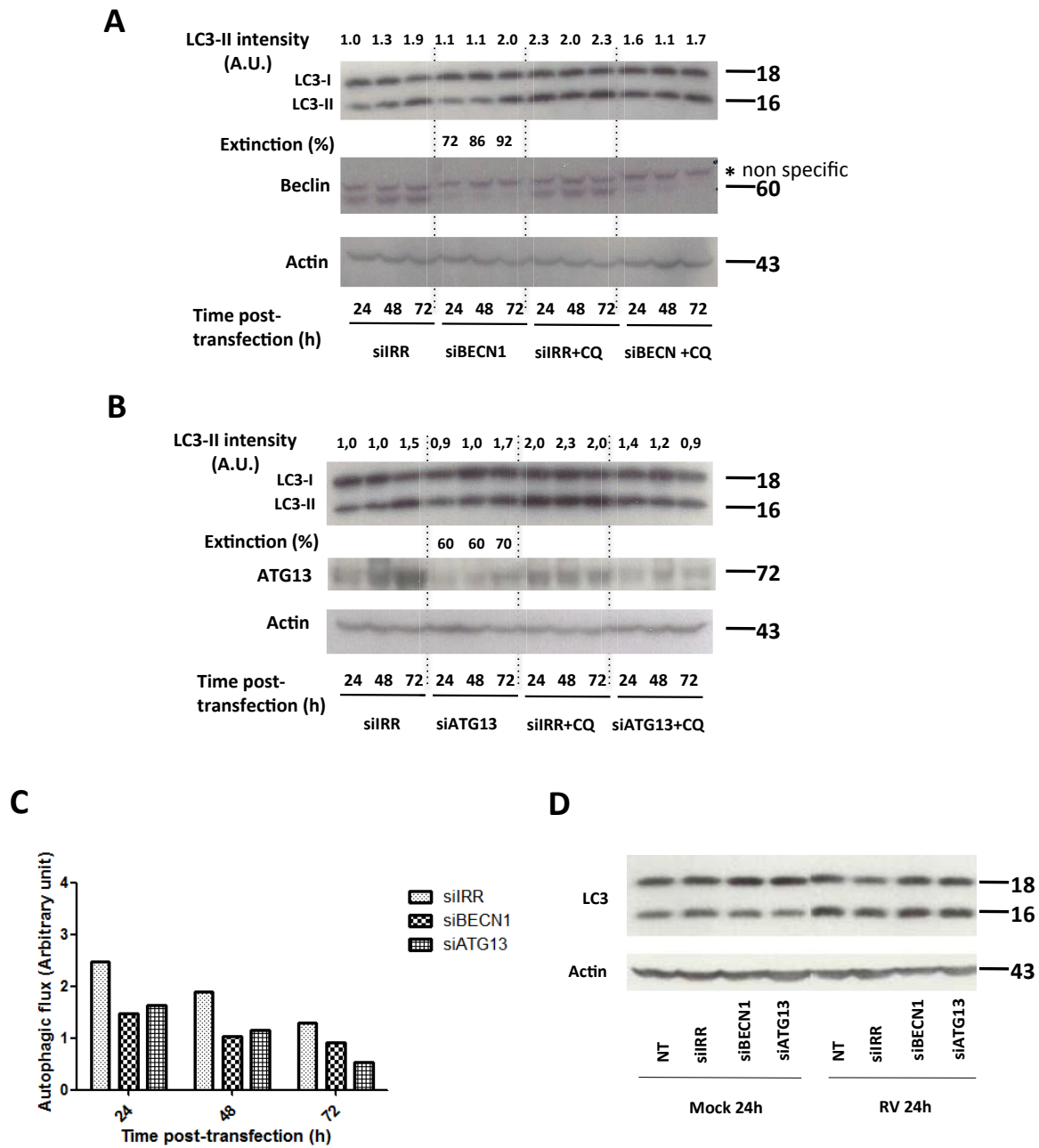
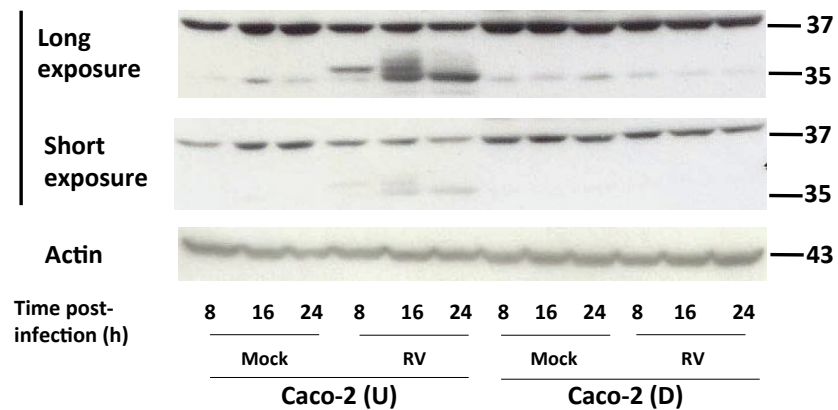
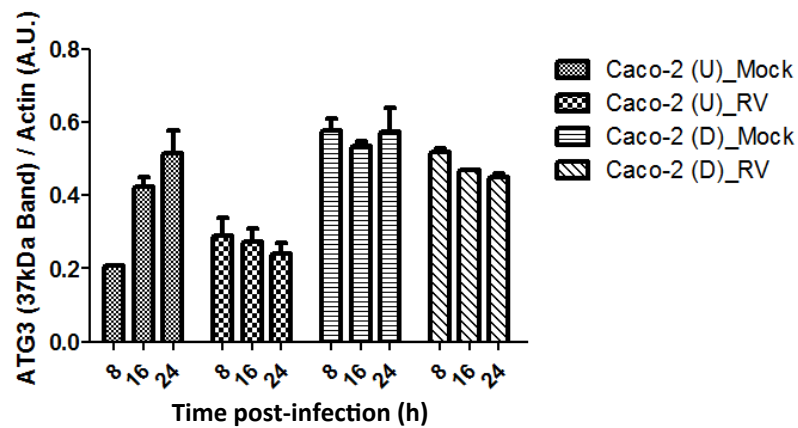


Figure 7

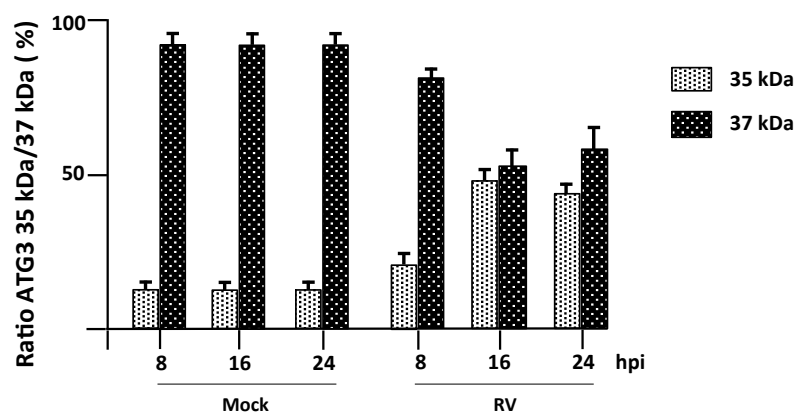
A



B



C



[illegible]

Chapitre III :

Implication potentielle de EDEM1 et de GRASP dans le trafic du rotavirus dans les cellules Caco-2

Comme je l'ai explicité dans l'introduction, les mécanismes cellulaires qui pourraient participer à la sortie du RE et/ou au trafic intracellulaire non conventionnel du rotavirus sont nombreux et n'ont pas été tous explorés. Nous avons vu dans les chapitres précédents que le stress du RE et l'UPR étaient certainement impliqués dans la morphogénèse virale. Nos résultats indiquent par contre que l'autophagie semble être exclue des processus d'assemblage du rotavirus. Pour compléter ce travail, j'ai entrepris des travaux complémentaires et préliminaires visant à identifier à terme les mécanismes cellulaires de sortie du RE. Cette partie exploratoire a consisté en l'étude de protéines impliquées dans des voies de trafic non conventionnelles connectées avec le stress du RE et/ou l'autophagie. J'ai donc entrepris l'étude par imagerie confocale de la localisation relative d'EDEM1 et de GRASP (voir respectivement les § 1.4.3 p34 et § 2.2.3 p44 de la section Introduction) avec les protéines virales, dans les cellules Caco-2 infectées par le rotavirus,

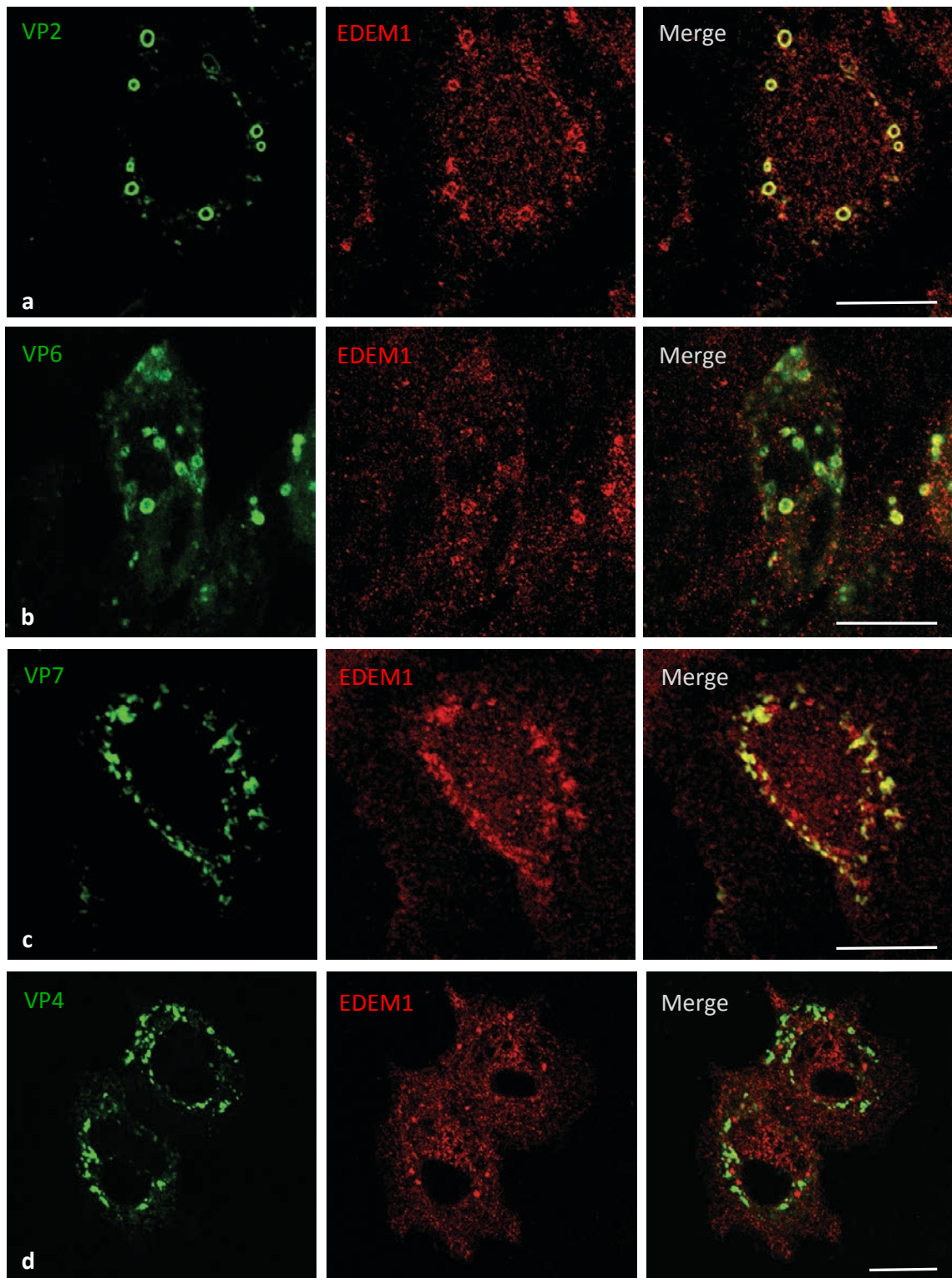
1. EDEM1 co-localise avec les composants des viroplasmes

Les vésicules EDEM représentent une voie de sortie hors du RE pour (i) certains acteurs de la machinerie ERAD tels que EDEM1, OS-9, SEL1L, et (ii) certaines protéines à dégrader, pour les conduire à la dégradation dans les lysosomes (*cf* §1.4.3 p34 de la section Introduction). Afin de déterminer si les particules virales sortent du RE via les vésicules EDEM, la localisation relative de la lectine EDEM1 par rapport à plusieurs protéines virales, structurales et non structurales, a été étudiée par microscopie confocale dans les cellules Caco-2. L'étude actuelle ne concerne que les cellules non différenciées. Les cellules ont été infectées par la souche RF du rotavirus à une multiplicité d'infection (MOI) de 10 *Plating unit* (PFU)/cellule et étudiées à 12 h post-infection (hpi), ce qui correspond aux étapes actives de la morphogénèse virale dans ces cellules.

Dans les cellules infectées, le marquage d'EDEM1 présente une distribution vraisemblablement réticulaire et également des structures punctiformes, circulaires ou demi-circulaires (**Fig 32**). De manière surprenante, ces structures marquées par EDEM1 le sont aussi par les protéines non structurales NSP5 et NSP2, deux composantes clefs des viroplasmes (Fabbretti et al., 1999; Contin et al., 2010) (panels **e** et **f**). EDEM1 co-localise également avec les protéines structurales VP2 et VP6, qui forment respectivement la couche

interne et intermédiaire de la capside et qui sont assemblées sur les virions au sein des viroplasm (Trask et al., 2012) (panels **a** et **b**). EDEM1 ne co-localise pas avec la protéine virale NSP4, protéine intégrale de la membrane du RE qui joue le rôle de récepteur des DLPs au cours de leur bourgeonnement dans le RE (O'Brien et al., 2000) (panel **g**). Cependant, on note clairement, à certains endroits, une disposition particulière de NSP4 et d'EDEM1, avec le marquage NSP4 entourant les structures punctiformes marquées positivement par EDEM1 (indiqué par des pointes de flèche). Cette distribution rappelle les parties de la membrane du RE contenant NSP4 et formant des protrusions qui entourent les viroplasm (Berkova et al., 2006; Hyser et al., 2010; Crawford et al., 2012). NSP3, la protéine non structurale impliquée dans la régulation de la traduction des ARNm cellulaires et qui ne se trouve pas dans les viroplasm (Piron et al., 1999), ne co-localise pas avec EDEM1 (panel **h**). Cet ensemble d'observations indique une localisation d'EDEM1 au niveau des viroplasm dans les cellules infectées.

Les TLPs ont été visualisés grâce aux anticorps monoclonaux M60 et 2G4, qui reconnaissent respectivement VP7 (Mirazimi and Svensson, 2000) et spécifiquement la forme de VP4 assemblée aux virions (Burns et al., 1988). VP7 est synthétisée par les ribosomes associés au RE, et assemblée sur les virions au sein de ce compartiment (Trask et al., 2012). A 12 hpi, VP7 est concentrée dans la zone périnucléaire où elle co-localise avec EDEM1 (panel **c**), ce qui correspond à la localisation connue de ces protéines dans le RE. Cependant, aucune co-localisation n'a été observée entre EDEM1 et les particules virales ayant acquis VP4 (panel **d**), suggérant que ces dernières ne se trouvent pas dans le même compartiment qu'EDEM1, que ce soit dans le RE ou dans des vésicules cytoplasmiques. La détermination d'un rôle potentiel des vésicules EDEM dans l'étape de sortie du RE des TLP nécessite des études plus approfondies.



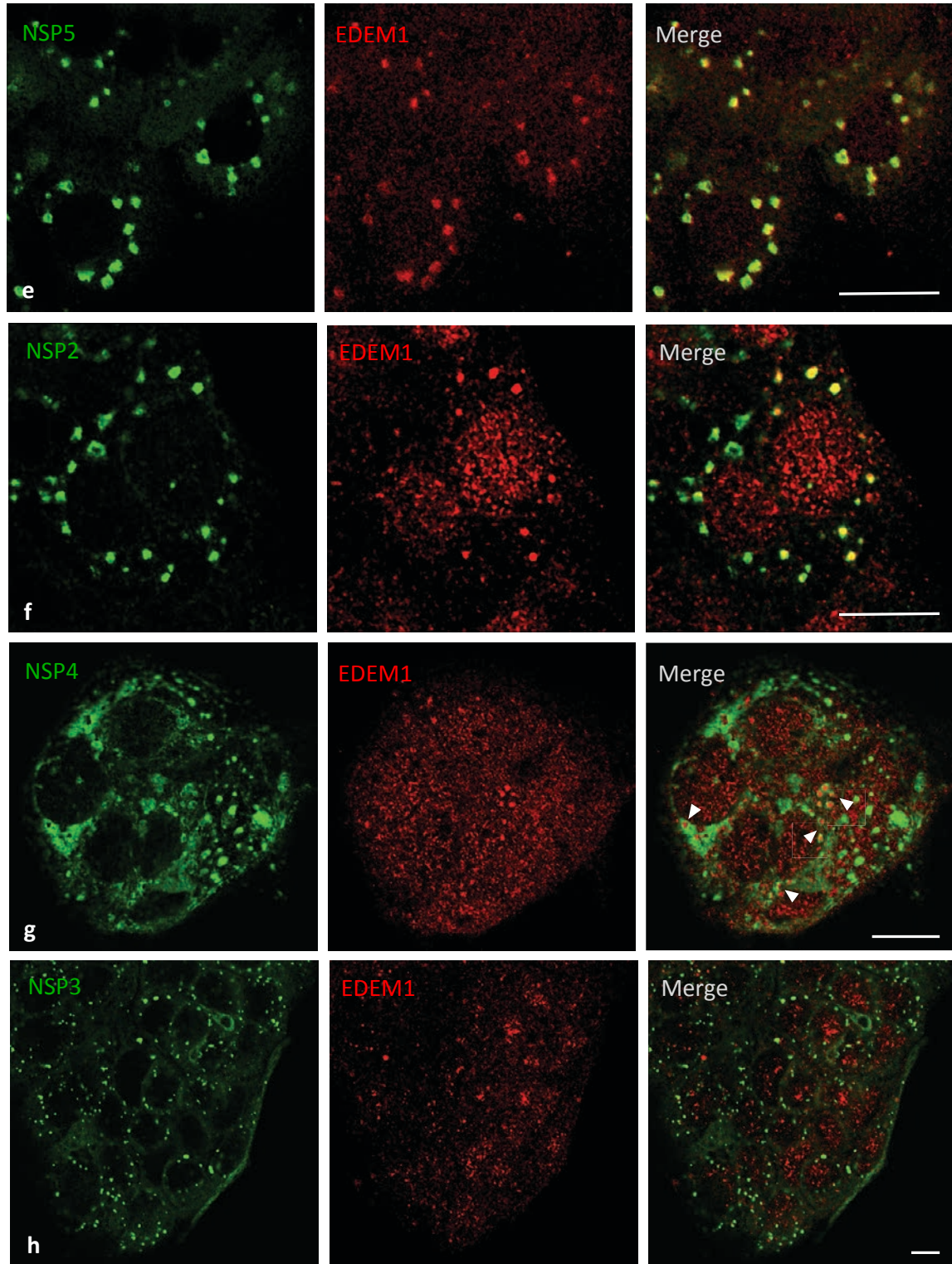


Figure 32. Localisation d'EDEM1 dans les cellules Caco-2 non différenciées infectées par le rotavirus. Les cellules sont infectées par la souche RF du rotavirus à une MOI de 10 PFU/cellule puis visualisées par microscopie confocale à 12 hpi. Les différentes protéines virales sont marquées en vert, EDEM1 est marquée en rouge. Pour chaque panel, une seule coupe optique est représentée. Les barres correspondent à 10 μ m.

2. L'infection par le rotavirus induit la désorganisation de GRASP55

Les protéines GRASP (GRASP55 et GRASP65 chez les mammifères) ont initialement été découvertes comme protéines d'échafaudage qui contribuent au maintien de la structure de l'appareil de Golgi (Barr et al., 1997; Shorter, 1999). De nombreuses études ont rapporté un autre rôle de GRASP, qui consiste en son implication dans les voies non conventionnelles de sécrétion, dont les mécanismes restent pour l'instant inconnus (*cf* §2.2 p40 de la section Introduction). Afin de déterminer si GRASP participe au trafic non conventionnel du rotavirus, la localisation cellulaire de GRASP55 vis-à-vis des TLPs a été étudiée par microscopie confocale dans les cellules Caco-2 différenciées, infectées ou non par le rotavirus. Les TLPs ont été visualisés grâce au marquage avec l'anticorps monoclonal M60 dirigé contre VP7 (Mirazimi and Svensson, 2000), ou l'anticorps monoclonal 2G4 dirigé spécifiquement contre la forme de VP4 assemblée sur les virions (Burns et al., 1988).

Dans les cellules non infectées, GRASP55 adopte une localisation périnucléaire qui correspond à l'appareil de Golgi (**Fig 33**, panel **a**). Dans les cellules infectées, nous avons constaté qu'une partie de GRASP55 forme des structures fragmentées, dispersées dans le cytoplasme (**Fig 33**, panels **b** et **c**), ce qui laisse supposer la mise en place d'un événement de sécrétion non conventionnelle, tel qu'il a été observé dans les cellules sécrétant l'IL1 β (Dupont et al., 2011). GRASP ne co-localise pas avec VP7 ou avec la forme de VP4 assemblée sur les virions (**Fig 33**, panels **b** et **c**), ce qui indique que GRASP n'est pas présent sur l'élément transporteur qui assure le trafic des protéines et/ou particules virales.

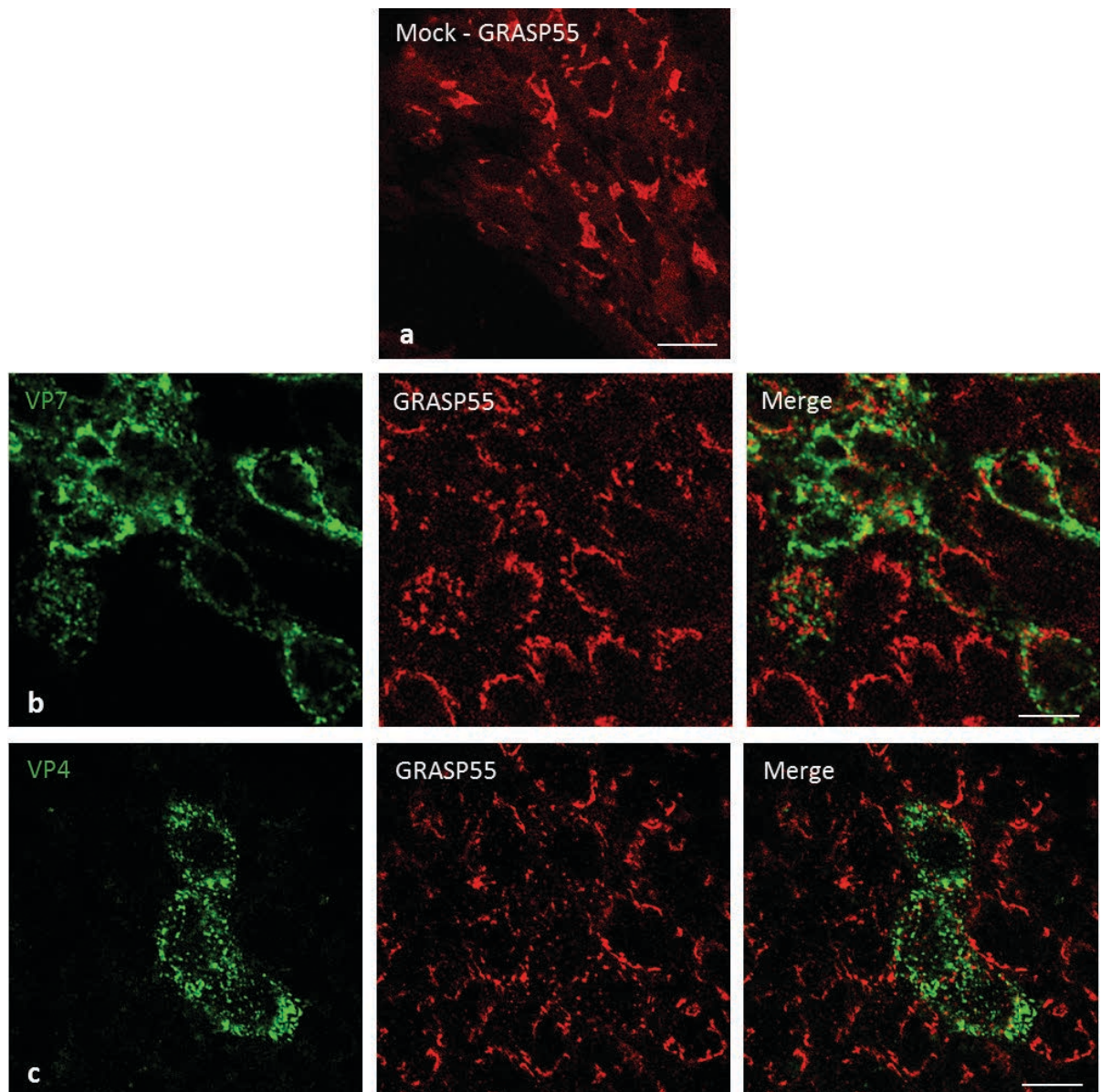


Figure 33. Localisation de GRASP55 dans les cellules Caco-2 différenciées infectées par le rotavirus. Les cellules sont non infectées (Mock) (panel a) ou infectées par la souche RF du rotavirus à une MOI de 10 PFU/cellule (panels b-c), puis visualisées par microscopie confocale à 12 hpi. Les protéines virales VP7 et VP4 sont marquées en vert, GRASP55 est marquée en rouge. Pour chaque panel, une seule coupe optique est représentée. Les barres correspondent à 10 μ m.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'UPR et l'autophagie sont deux processus cellulaires connectés, qui jouent un rôle prépondérant dans la survie cellulaire sous diverses situations de stress (Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007; Sano and Reed, 2013). L'interaction des virus avec les machineries de l'UPR et de l'autophagie conditionne la réplication virale. Au cours de l'évolution, les virus ont développés un grand nombre de mécanismes pour moduler l'UPR (He, 2006) et l'autophagie (Jordan and Randall, 2012) afin d'optimiser leur cycle réplicatif. Ce travail avait pour objectif de déterminer le rôle fonctionnel de l'UPR et de l'autophagie dans la morphogénèse du rotavirus dans le but de mieux comprendre les mécanismes de sortie du RE et de trafic intracellulaire non conventionnel des particules virales dans les cellules épithéliales intestinales.

1. L'UPR dans la morphogénèse du rotavirus

Un travail initié au laboratoire (i) a permis d'isoler les intermédiaires d'assemblage du rotavirus correspondant aux étapes de sa morphogénèse qui se déroulent à proximité ou dans le RE (bourgeonnement dans le RE, assemblage intra-réticulaire et sortie du RE), et (ii) a identifié l'association des chaperonnes réticulaires BiP, CNX, CRT et PDI avec ces complexes viraux (**Fig 1-7, Manuscrit 1**), évoquant ainsi des liens moléculaires entre l'assemblage intra-réticulaire du rotavirus et l'induction de l'UPR. Mon travail de thèse a permis de montrer que l'infection à rotavirus active l'UPR et module de manière sélective les trois voies de cette réponse cellulaire, recrutant ATF6, mais pas PERK, vers les viroplasmes. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques et d'outils génétiques a montré que seules les voies IRE1 et PERK sont requises pour une réplication efficace du virus.

1.1. Activation et modulation de l'UPR par le rotavirus

Ce travail a tout d'abord montré que l'infection à rotavirus active les trois voies de l'UPR. L'activation des voies IRE1 et ATF6 ont été mises en évidence respectivement par l'épissage de l'ARNm *XBP1* et par la translocation nucléaire de p50ATF6 (**Fig 8A et 8B, Manuscrit 1**). L'activation de la voie PERK a été mise en évidence de manière indirecte en montrant que le GSK2606414, un inhibiteur spécifique de l'activité kinase de PERK, inhibe jusqu'à 90% de la production virale (**Fig 10, Manuscrit 1**), ce qui suggère que non seulement PERK est activée mais surtout que la signalisation via PERK est requise pour la morphogénèse du virus (discutée ultérieurement).

De nombreux virus modulent de manière différentielle les trois voies de l'UPR (*cf* §3.4 p59 de la section Introduction). Lors de l'infection à rotavirus, nous avons observé une concentration de PERK dans la zone périnucléaire où se trouvait aussi CNX (**Fig 9D, Manuscrit 1**), ce qui correspond au sous-compartiment ERQC précédemment décrit (Kamhi-Nesher et al., 2001). Etant donné que BiP n'est pas concentré dans le sous-compartiment ERQC (Kamhi-Nesher et al., 2001), il a été suggéré que la concentration des senseurs de l'UPR dans ce sous-compartiment favoriserait leur activation (Kondratyev et al., 2007). A la différence de PERK, une partie d'ATF6 est recrutée vers les viroplasmes où elle co-localise avec VP2 et l'ARNdb viral (**Fig 9C, Manuscrit 1**). Cela constitue un mécanisme d'atténuation de la voie ATF6 par le rotavirus, comme l'ont déjà suggéré Zambrano et collègues (Zambrano et al., 2011). La signalisation via IRE1, quant à elle, n'est pas atténuée au cours de l'infection, comme le suggère l'augmentation progressive de la forme épissée de l'ARNm *XBP1* de 2 à 8 hpi (**Fig 8A, Manuscrit 1**). Nous avons d'ailleurs observé une co-localisation des complexes viraux avec les senseurs de l'UPR (**Fig 9, Manuscrit 1**), ce qui suggère un lien moléculaire entre l'assemblage viral et la modulation des voies de signalisation de l'UPR. Cela explique certainement le fait que différentes souches de rotavirus puissent moduler différemment les trois voies de l'UPR, car ces souches ne sollicitent pas de manière identique la machinerie de repliement et de contrôle qualité des protéines dans le RE ainsi que les senseurs de l'UPR. Par exemple les souches OSU et RRV induisent la séquestration à la fois d'ATF6 et de PERK dans les viroplasmes (Zambrano et al., 2011), tandis que la souche RF utilisée dans ce travail séquestre uniquement ATF6.

1.2. Rôle fonctionnel des voies IRE1 et PERK dans la morphogénèse du rotavirus

Notre exploration du rôle fonctionnel de l'UPR dans la morphogénèse du rotavirus est principalement basée sur l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de référence, spécifiques de chacune des voies de l'UPR et dont la non-toxicité sur les cellules aux concentrations utilisées a été vérifiée. Le 4μ8c (Cross et al., 2012) et la toyocamicine (Ri et al., 2012) sont deux inhibiteurs qui ciblent le domaine RNase d'IRE1 et inhibent efficacement l'épissage de l'ARNm *XBP1* ainsi que l'activité RIDD, sans affecter l'activité kinase d'IRE1 ni les voies PERK et ATF6. Le GSK2606414 fait partie d'un groupe d'inhibiteurs de kinases optimisés pour être hautement efficaces et spécifiques de PERK (les IC₅₀ pour les autres kinases testées sont au moins 100 fois supérieures à l'IC₅₀ pour PERK) (Axten et al., 2012). Ces trois inhibiteurs affectent significativement la production virale (**Fig**

10A, Manuscrit 1), ce qui indique que les voies PERK et IRE1 sont requises pour la morphogénèse du rotavirus. Au contraire, l'inhibition de la voie ATF6, via le 16F16 qui inhibe le trafic d'ATF6 vers l'appareil de Golgi (Higa et al., 2014) (**Fig 10A, Manuscrit 1**), ou via l'extinction de l'expression d'ATF6 par shRNA (**Fig 10B, Manuscrit 1**), n'a pas d'impact sur la production virale. Ces résultats sont en corrélation avec la façon dont l'infection à rotavirus affecte différenciellement les senseurs de l'UPR, atténuant vraisemblablement la signalisation *via* ATF6 mais pas celles *via* PERK et IRE1.

Il a été montré que dans les cellules infectées par le rotavirus, la kinase principalement responsable de la phosphorylation d'eIF2 α était PKR et pas PERK (Rojas et al., 2010b). Cela suggère que l'effet bénéfique de la voie PERK sur la morphogénèse virale ne passerait pas par les effecteurs P-eIF2 α /ATF4. Un autre effecteur de PERK, le facteur de transcription Nrf2, a été identifié comme une seconde cible phosphorylable par PERK (Cullinan et al., 2003). Nrf2 contribue à la résolution du stress du RE en induisant l'expression (i) des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant, ce qui permet de limiter l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène générées lors du stress du RE (Cullinan and Diehl, 2006) et (ii) des gènes codant pour les sous-unités du protéasome, ce qui permet de renforcer la dégradation des protéines du RE *via* la voie ERAD (Kwak et al., 2003).

L'activité RNase d'IRE1 permet, entre autres, l'épissage de l'ARNm *XBP1* et la synthèse du facteur de transcription XBP1 actif (Hetz et al., 2013). L'effet négatif du 4 μ 8c ou de la toyocamicine sur la production virale suggère qu'un ou plusieurs des gènes transcrits par XBP1 seraient impliqués dans la morphogénèse du rotavirus. XBP1 est connu comme induisant l'expression des protéines chaperonnes, des acteurs de la machinerie ERAD (Yoshida et al., 1998, 2001a; Yamamoto et al., 2004) et des enzymes du métabolisme lipidique (Lee et al., 2008). D'ailleurs, dans le contexte où l'expression des gènes cibles de l'UPR est contrecarrée au niveau traductionnel par le *shut-off* de la traduction des protéines cellulaires provoqué par la protéine virale NSP3 (Trujillo-Alonso et al., 2011), nos résultats suggèrent que le rotavirus ne requerrait pas une expression optimale des gènes cibles de XBP1 pour sa morphogénèse.

Le Salubrinal (Boyce et al., 2005) et le Guanabenz (Tsaytler et al., 2011) figurent parmi les inhibiteurs de stress du RE car ils maintiennent eIF2 α à l'état phosphorylé et de ce fait inhibent la reprise de la synthèse protéique. Dans les cellules infectées par le rotavirus, la traduction des protéines cellulaires est déjà régulée négativement par deux mécanismes : (i) la phosphorylation d'eIF2 α principalement par PKR (Rojas et al., 2010b) et (ii) le *shut-off* de la

traduction induit par NSP3 (Piron et al., 1998). Il a été montré que le Salubrinal n'affecte pas la traduction des protéines virales (Rojas et al., 2010b). Ainsi, le fait que le Salubrinal et le Guanabenz réduisent jusqu'à 95% de la production virale suggère que le déroulement correct du cycle viral nécessite la traduction des protéines cellulaires, bien que ce processus soit à un niveau réduit. En accord avec cela, nous avons observé que l'effet du Salubrinal est cumulatif avec celui du 4μ8c dans la réduction de la production virale (**Fig 10A, Manuscrit 1**).

2. L'autophagie dans la morphogénèse du rotavirus

Notre étude de l'autophagie au cours de l'infection à rotavirus dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2 s'inscrit dans le contexte où (i) le rôle de l'autophagie dans la morphogénèse du rotavirus reste en débat (Crawford et al., 2012; Arnoldi et al., 2014) et (ii) où le modèle cellulaire MA104 utilisé dans les études antérieures ne permet pas de voir un potentiel rôle de l'autophagie dans le trafic intracellulaire non conventionnel des particules virales. Nous avons montré que : (i) le rotavirus interfère à la fois avec l'initiation et les étapes tardives de l'autophagie ; (ii) uniquement dans les cellules Caco-2 au stade non différencié, l'infection induit une lipodation de LC3 qui n'est pas reliée au processus autophagique, qui ne dépend pas de la machinerie canonique de l'autophagie, et qui corrèle avec un clivage spécifique d'ATG3; (iii) ni l'autophagie, ni la lipodation de LC3 induite par l'infection, ne sont impliquées dans la morphogénèse virale.

2.1. Changement du statut autophagique des cellules Caco-2 au cours de la différenciation

L'importance de l'autophagie est reconnue durant le développement embryonnaire chez les mammifères et dans la différenciation cellulaire (érythrocytes, lymphocytes, adipocytes) (Mizushima and Levine, 2010). Des travaux précédents du laboratoire dans les cellules intestinales HT-29 et Caco-2 ont montré une diminution de l'activité autophagique au cours de la différenciation cellulaire, caractérisée par une augmentation de la stabilité des glycoprotéines, dont l'enzyme saccharase-isomaltase (SI) de la bordure en brosse (Ogier-Denis et al., 1988; Trugnan et al., 1991; Houri et al., 1993). Ce changement de l'activité autophagique pourrait faire que la relation rotavirus – autophagie dans les cellules intestinales différenciées soit différente de celle observée dans les cellules non différenciées, ou encore de celle des cellules MA104, qui sont des cellules rénales non polarisées, éloignées morphologiquement et fonctionnellement de la cible naturelle du rotavirus. Pour ces raisons,

nous avons choisi le modèle cellulaire Caco-2 pour étudier l'autophagie au cours de l'infection à rotavirus, en comparant les cellules différenciées et non différenciées.

Nous avons tout d'abord caractérisé le statut autophagique basal des cellules Caco-2 non différenciées *versus* différenciées, en dehors du contexte de l'infection, statut défini par (i) le niveau d'expression des marqueurs de l'autophagie et (ii) par la capacité dégradative, c'est-à-dire l'intensité du flux autophagique. Nous avons démontré une forte diminution du flux autophagique dans les cellules différenciées (**Fig 2 et 3, Manuscrit 2**). Dans le même temps, nous avons constaté que ces cellules exprimaient un niveau plus élevé de protéines clefs de l'autophagie comme LC3, ATG4B, ATG16L1 et ATG3 (**Fig 1C et 1D, Figure 7, Manuscrit 2**), comparé aux cellules non différenciées. Cela suggère qu'il y aurait probablement plus d'initiation de l'autophagie dans les cellules différenciées, ce qui n'a jusqu'alors pas été adressé, car les études antérieures ont évalué le statut autophagique uniquement par la capacité dégradative (Groulx et al., 2012; Houri et al., 1993; Ogier-Denis et al., 1988; Trugnan et al., 1991). Ceci constitue donc une question qui reste à élucider.

Il est bien établi que le cycle du rotavirus dans les cellules Caco-2 différenciées est un cycle non lytique (Svensson et al., 1991; Jourdan et al., 1997; Halasz et al., 2010), les virions étant relargués selon une voie de trafic non conventionnelle contournant l'appareil de Golgi (Jourdan et al., 1997), contrairement au cycle lytique observé dans les cellules MA104 (Musalem and Espejo, 1985; Pérez et al., 1998). Cependant, le mode de sortie du rotavirus des cellules Caco-2 non différenciées n'a jusqu'à présent pas été caractérisé. Nous avons montré que dans les cellules Caco-2, quel que soit leur état de différenciation, le rotavirus adopte un cycle non lytique (**Fig 1D, Manuscrit 2**). Ce constat indique que les cellules Caco-2, non différenciées ou différenciées, sont un modèle cellulaire judicieux pour étudier une potentielle contribution de l'autophagie dans le trafic non conventionnel du rotavirus, ce qui n'est probablement pas le cas des cellules MA104 dans lesquelles ont été réalisés les précédents travaux sur les relations autophagie-rotavirus (Crawford et al., 2012; Arnoldi et al., 2014).

2.2. L'infection à rotavirus bloque la formation et la maturation des autophagosomes

Le statut autophagique basal, qui varie en fonction de l'état de différenciation des cellules Caco-2, ne conditionne pas la façon dont l'infection à rotavirus module le processus autophagique. L'infection à rotavirus n'induit pas de changement du nombre d'autophagosomes dans les cellules Caco-2, quel que soit leur état de différenciation (**Fig 2, Manuscrit 2**). Tandis que la rapamycine, qui induit l'autophagie et la chloroquine, qui bloque

la fusion des autophagosome avec les lysosomes conduisent à une augmentation du nombre d'autophagosomes dans les cellules non infectées, ces drogues ne montrent pas d'effet sur le nombre d'autophagosomes dans les cellules infectées. Cela suggère fortement que l'infection à rotavirus inhibe à la fois la formation des autophagosomes et la fusion de ceux-ci avec les lysosomes.

Le blocage du flux autophagique par l'infection à rotavirus a également été observé dans les cellules MA104 (Crawford et al., 2012; Arnoldi et al., 2014). Concernant l'étape d'initiation de l'autophagie, Crawford et collègues ont conclu indirectement que l'infection à rotavirus induit l'autophagie, par un mécanisme impliquant la protéine virale NSP4 qui provoque la fuite du Ca^{2+} du RE, ce qui active l'autophagie via la voie CaMKK β /AMPK (Crawford et al., 2012). D'autres signaux potentiellement inducteurs de l'autophagie comme l'activation de la voie JNK (Holloway and Coulson, 2006) ou l'activation de l'UPR (Zambrano et al., 2011; Trujillo-Alonso et al., 2011) sont initiés par l'infection à rotavirus. Notre travail indique que, malgré la présence de ces signaux, le rotavirus bloque efficacement la formation et la dynamique des autophagosomes. Il reste bien entendu à identifier la ou les protéine(s) virale impliquées dans ces effets.

2.3. L'infection à rotavirus induit une lipidation de LC3 non reliée à l'autophagie, uniquement dans les cellules Caco-2 non différenciées

La relation rotavirus - autophagie s'avère bien plus complexe car elle implique un découplage entre : (i) d'un côté, l'effet de l'infection sur le processus autophagique proprement dit, c'est-à-dire de la formation des autophagosomes jusqu'à leur fusion avec les lysosomes, et qui, comme discuté précédemment, ne dépend pas de l'état de différenciation des cellules Caco-2 ; (ii) d'un autre côté, l'effet de l'infection sur le fonctionnement de la machinerie autophagique.

De manière surprenante, uniquement dans les cellules Caco-2 non différenciées, l'infection à rotavirus induit une augmentation de la forme lipidée de LC3 (LC3-II) aux temps intermédiaires et tardifs du cycle viral (16 et 24 hpi) (**Fig 3, Manuscrit 2**). Cette lipidation de LC3 n'est pas associée à l'autophagie, puisque elle ne dépend pas de la machinerie canonique d'induction de ce processus: elle a toujours lieu même en absence de Beclin-1 ou d'ATG13, deux protéines clefs impliquées précocement dans l'initiation de l'autophagie (Yang and Klionsky, 2010) (**Fig 6, Manuscrit 2**). Ces données sont cohérentes avec l'observation que l'infection interfère avec la formation des autophagosomes (**Fig 2, Manuscrit 2**). Nos

résultats sont donc de ce point de vue en parfait accord avec les observations d'Arnoldi et collègues (Arnoldi et al., 2014).

2.4. La lipidation de LC3 induite par le rotavirus dans les cellules Caco-2 non différenciées est corrélée avec l'apparition de formes clivées d'ATG3

Les mécanismes qui assurent la restriction spatiale de LC3 sur les membranes autophagiques, bien que incomplètement caractérisés, semblent reposer sur le complexe ATG5-ATG12-ATG16 (Fujita et al., 2008) ainsi que sur ATG3 (Noda et al., 2012; Nath et al., 2014). Nous avons émis l'hypothèse que l'infection à rotavirus perturberait le fonctionnement de ces enzymes directement impliquées dans la lipidation de LC3, pouvant conduire à une lipidation ectopique sur des membranes autres que les autophagosomes. L'infection à rotavirus n'affecte pas le niveau d'ATG16L1, ni la quantité de complexe ATG5-ATG12 (**Fig 1C, Manuscrit 2**). Cependant, l'infection provoque le clivage d'ATG3, cela uniquement dans les cellules Caco-2 non différenciées (**Fig 7, Manuscrit 2**). L'apparition des formes clivées d'ATG3 suit la même cinétique que l'augmentation de la lipidation de LC3. Il s'agit d'un clivage progressif, avec l'apparition de différents produits de clivages à 16 hpi, pour aboutir, à 24 hpi, à une seule forme d'environ 35 kDa, soit environ 2 kDa de moins que la forme native.

A notre connaissance, une telle modification post-traductionnelle d'ATG3 n'a à ce jour jamais été décrite. Oral et collègues ont mentionné un mécanisme d'inhibition de l'autophagie dû au clivage d'ATG3 par la Caspase 8, qui génère deux fragments de taille semblable (Oral et al., 2012). Dans les cellules Caco-2, le clivage d'ATG3 observé au cours de l'infection à rotavirus serait soumis à deux niveaux de modulation : d'une part par l'infection et d'autre part par l'état de différenciation des cellules. Le rôle de cette modification d'ATG3 dans la modulation de l'autophagie et/ou dans l'induction d'une lipidation ectopique de LC3 par le rotavirus reste à élucider.

2.5. Ni l'autophagie, ni la lipidation de LC3 induite par le rotavirus, ne sont impliquées dans la morphogénèse virale

Ce travail a fourni plusieurs preuves directes qui convergent vers le fait que l'autophagie n'est pas impliquée dans la morphogénèse du rotavirus. En effet, la modulation de l'autophagie, que ce soit (i) une induction par la rapamycine, (ii) une inhibition par l'extinction des protéines clefs de l'autophagie comme Beclin-1, ATG13 ou LC3B, ou (iii) un blocage du flux autophagique par la chloroquine, n'affecte que peu, ou pas, la production virale (**Fig 5 et 8, Manuscrit 2**). Dans les conditions d'induction de l'autophagie ou de

blocage du flux, la tendance serait plutôt à la diminution de la production virale, alors que dans les conditions de suppression de LC3, donc de l'autophagie canonique, la tendance est inverse, à savoir une légère augmentation de la production virale. Ces observations qui restent à confirmer, plaideraient plutôt pour un rôle de contrôle négatif de l'autophagie sur l'infection à rotavirus.

Afin de répondre à notre question spécifique concernant une potentielle implication des membranes autophagiques dans le trafic intracellulaire des protéines et/ou particules virales, la localisation relative des protéines virales avec la protéine LC3 marqueur des autophagosomes a été examinée par imagerie confocale (**Fig 4, Manuscrit 2**). Nous n'avons observé aucune co-localisation de LC3 avec les protéines structurales du rotavirus, ce qui indique que les autophagosomes ne sont pas des plateformes assurant le trafic non conventionnel des virions. Aucune co-localisation de LC3 n'est non plus observée avec les viroplasmes, marqués par les protéines non structurales NSP5 et NSP2. Enfin l'absence de co-marquages des structures punctiformes de LC3 (dots LC3) avec l'anticorps 2G4, qui ne reconnaît que la protéine VP4 assemblée sur les particules virales (Burns et al., 1988), indiquent que les membranes autophagiques ne peuvent servir au transport des néo-virions. L'absence d'interaction entre les protéines virales et les autophagosomes que nous avons observée rejoint parfaitement les observations d'Arnoldi et collègues dans les cellules MA104 (Arnoldi et al., 2014). Nous n'excluons pas le fait que des autophagosomes en cours de formation à partir du RE puissent interagir avec les viroplasmes, comme l'ont observé Crawford et collègues (Crawford et al., 2012), étant donné que les viroplasmes sont à proximité, voire en contact avec la membrane du RE (Petrie et al., 1984). Cependant, l'ensemble de nos résultats suggère que même s'il peut avoir lieu, ce phénomène n'aurait pas de conséquences sur la morphogénèse du rotavirus.

Etant donné que dans les cellules Caco-2 non différenciées le rotavirus induit une lipodation de LC3 qui n'est pas associée aux autophagosomes, nous avons cherché à déterminer le rôle de processus dans le cycle viral. L'extinction de LC3B par siRNA, quoique efficace jusqu'à plus de 70%, ne réduit pas le titre viral (**Fig 8, Manuscrit 2**). Cela indique que la morphogénèse du rotavirus ne requiert pas les membranes contenant LC3-II, incluant les autophagosomes et les membranes de nature indéterminée, induites par l'infection. L'indépendance de la production virale par rapport à la lipodation de LC3 est aussi soulignée par le fait que les cellules Caco-2 différenciées, dans lesquelles l'infection n'induit pas de lipodation de LC3, produisent jusqu'à 100 fois plus de virus que les cellules non différenciées (**Fig 5, Manuscrit 2**). A ce niveau, nos résultats diffèrent d'une précédente observation selon

laquelle l'extinction de LC3 réduisait d'environ 2,5 fois la production virale dans les cellules MA104 (Arnoldi et al., 2014). Cela pourrait s'expliquer par le fait que la morphogénèse du rotavirus dans les cellules Caco-2 diffère radicalement de celle dans cellules MA104.

3. Potentielle implication de EDEM1 dans la morphogénèse du rotavirus

Les vésicules contenant, entre autres, des composants de la machinerie ERAD comme EDEM1, OS-9 et SEL1L, appelées « vésicules EDEM », constituent un des mécanismes permettant d'adresser des constituants intra-réticulaires vers les lysosomes (Calì et al., 2008; Zuber et al., 2007). La formation de ces vésicules reposerait sur l'association de la forme non lipidée de LC3 (LC3-I) à la partie cytoplasmique de SEL1L, ce qui permet de concentrer SEL1, EDEM1 et OS9 dans ces vésicules (Bernasconi et al., 2012). Ces vésicules ont été impliquées dans le transport du coronavirus du RE vers le milieu extracellulaire (Reggiori et al., 2010). Deux arguments laissent penser que le rotavirus n'emprunterait pas les vésicules EDEM pour sortir du RE : (i) aucune co-localisation des protéines virales avec LC3 n'a été observée (**Fig 4, Manuscrit 2**); (ii) l'extinction de LC3 ne réduit pas la production virale (**Fig 8, Manuscrit 2**).

Cependant, de manière inattendue, nous avons observé la localisation d'EDEM1 au niveau des viroplasmes dans les cellules infectées (**Fig 32**). La localisation intracellulaire d'EDEM1 est plus complexe qu'un pool réticulaire et un pool cytoplasmique contenu dans des vésicules recouvertes de LC3-I, car EDEM1 peut également se retrouver libre dans le cytoplasme. En effet, Le Fourn et collègues ont montré qu'une fois dans le cytoplasme, la couche lipidique des vésicules EDEM se dissout selon un mécanisme encore inconnu, et qu'ensuite les protéines précédemment contenues dans ces vésicules sont enveloppées dans des autophagosomes, puis dégradées dans les lysosomes (Le Fourn et al., 2013). La nature du pool d'EDEM1 associé aux viroplasmes, et surtout le rôle de cette association dans le cycle viral, devront faire l'objet d'études ultérieures.

4. Potentielle implication des protéines GRASP dans le trafic intracellulaire du rotavirus

Une caractéristique émergente commune à plusieurs voies de sécrétion non conventionnelle est l'implication des protéines GRASP (GRASP55 et GRASP65 chez les mammifères), connues initialement pour leur rôle dans le maintien de l'empilement des citernes golgiennes (Giuliani et al., 2011). Des expériences préliminaires dans les cellules

Caco-2 différenciées ont montré que l'infection à rotavirus induisait un changement de localisation de GRASP55 (**Fig 33**). Dans les cellules non infectées, GRASP adopte une localisation correspondant aux citernes golgiennes, tandis que dans les cellules infectées, une partie de GRASP est dispersée dans le cytoplasme. Une telle désorganisation de GRASP a été précédemment observée lors de la sécrétion non conventionnelle de l'IL1 β (Dupont et al., 2011), ce qui suggère que l'infection à rotavirus induit la mise en place d'une voie de sécrétion non conventionnelle.

La machinerie de l'autophagie semble converger vers une voie de sécrétion non conventionnelle impliquant GRASP, dans laquelle les membranes autophagiques serviraient de transporteur de cargo, tandis que le rôle de GRASP reste obscur (Deretic et al., 2012). GRASP serait probablement impliqué dans l'arrimage des vésicules de transport de cargos avec leur compartiment cible, ce rôle étant déduit de son rôle dans l'empilement des citernes golgiennes (Giuliani et al., 2011), et dépendrait des motifs PDZ (Giuliani et al., 2011) dont le rôle dans le ciblage apical a été suggéré (Gee et al., 2011). Dans les cellules Caco-2 infectées, les particules virales matures, visualisées par les protéines structurales VP7 et VP4 exposées à leur surface, ne co-localisent pas avec GRASP55 (**Fig 33**). Cela indique que GRASP n'est pas impliqué directement dans le trafic non conventionnel du rotavirus en tant que protéine d'arrimage présent sur l'élément transporteur. Malgré cela, et malgré le fait que le trafic intracellulaire du rotavirus n'emprunte pas les autophagosomes, le rôle de GRASP dans l'étape de sortie du rotavirus mérite d'être approfondi car (i) le rôle de GRASP en tant que protéine d'arrimage dans la sécrétion non conventionnelle n'est qu'un rôle supposé, et (ii) l'implication de GRASP et de la machinerie autophagique dans une même voie de sécrétion non conventionnelle reste pour l'instant une corrélation tirée de plusieurs exemples de cargos sécrétés de manière non conventionnelle (Dupont et al., 2011; Duran et al., 2010; Gee et al., 2011; Kinseth et al., 2007; Manjithaya et al., 2010).

5. Conclusions et perspectives de recherche

En conclusion, mon travail de thèse, dédié à l'étude de l'implication de l'UPR et de l'autophagie dans la morphogénèse du rotavirus, a montré que (i) l'infection à rotavirus active et module de manière différentielle les trois voies de l'UPR ; (ii) les voies IRE1 et PERK sont strictement requises pour une réplication efficace du virus ; (iii) l'infection bloque à la fois la formation et la maturation des autophagosomes ; mais (iv) induit, uniquement dans les cellules Caco-2 non différenciées, une lipodation ectopique de LC3, qui n'est pas associée aux

autophagosomes, ne dépend pas de la machinerie canonique d'induction de l'autophagie et corrèle avec un clivage de l'enzyme ATG3 impliquée dans le processus de lipitation; (v) ni l'autophagie, ni la lipitation de LC3 induite par l'infection ne sont requis pour la morphogénèse virale.

Les résultats obtenus ouvrent plusieurs perspectives de recherche, qui découlent plus ou moins directement de la problématique initiale du travail.

5.1. Caractérisation du rôle des acteurs de la voie ERAD dans la sortie du RE du rotavirus

En montrant l'importance fonctionnelle de la voie IRE1 de l'UPR dans la morphogénèse du rotavirus, ce travail suggère une implication des composants de la machinerie ERAD, dont l'expression est activée par XBP1 (Yoshida et al., 2001a; Yamamoto et al., 2004). De ce point de vue, la localisation d'EDEM1 au niveau des viroplasmes, constatée de façon inattendue dans ce travail, mérite d'être caractérisé plus amplement.

L'exemple des virus membres de la famille des *Polyomaviridae*, tel que le SV40, est ici particulièrement intéressant dans le sens où il s'agit de virus nus, qui atteignent le RE après endocytose, puis doivent ressortir de ce compartiment pour débiter leur cycle infectieux dans le cytoplasme (Inoue and Tsai, 2011). Il a été montré que ces virus requièrent des composants de la machinerie ERAD pour sortir du RE (Bennett et al., 2013; Geiger et al., 2011). Dû à la contrainte de taille, il est peu probable que les particules virales ressortent du RE par rétro-translocation. Ainsi, l'exemple des Polyomavirus suggère fortement l'existence d'une voie de sortie du RE n'empruntant pas le complexe de rétro-translocation mais une partie de la machinerie ERAD. Concernant le rotavirus, deux travaux ont montré que l'intégrité de la machinerie ERAD et du protéasome est requise pour sa morphogénèse (Broquet et al., 2006; Contin et al., 2010). Il importe donc de poursuivre cette piste de recherche.

5.2. Caractérisation du mécanisme de lipitation de LC3 induite par l'infection à rotavirus dans les cellules Caco-2 non différenciées

L'étude de l'autophagie au cours de l'infection à rotavirus que j'ai entreprise durant ma thèse, bien qu'elle indique clairement que ce processus n'est pas impliqué dans la morphogénèse virale, a révélé plusieurs aspects atypiques dans l'interaction du rotavirus avec la machinerie autophagique : (i) une lipitation ectopique de LC3 non associée aux autophagosomes; (ii) un clivage d'ATG3 jusqu'alors jamais décrit et (iii) le fait que ces deux processus dépendent de l'état de différenciation des cellules Caco-2.

La modification d'ATG3 observée au cours de l'infection, bien que surprenante, n'est pas anodine dans le sens où ATG3 est l'enzyme directement impliquée dans la lipidation de LC3 (Noda, 2012). De plus ATG3 est impliquée dans la sélection du site membranaire où a lieu cette lipidation, par un mécanisme de détection de la courbure membranaire (Nath, 2014). De ce fait, une perspective proche émergeant directement de ce travail est la caractérisation du clivage d'ATG3 induit par l'infection ainsi que le lien avec la lipidation ectopique de LC3. Nous avons d'ailleurs entrepris cette étude en nous appuyant sur l'expertise du laboratoire en spectrométrie de masse. Ce travail devrait permettre d'identifier le site de clivage d'ATG3, puis de rechercher les mécanismes responsables de ce clivage. Un tel mécanisme pourrait être à l'origine d'une voie de régulation de l'autophagie jusqu'ici inconnue.

5.3. Caractérisation de l'autophagie au cours de la différenciation des cellules Caco-2

Le rôle de l'autophagie dans la différenciation des cellules intestinales n'était pas le point central de ce travail. Néanmoins, le fait que nous ayons observé dans les cellules Caco-2 différenciées une forte expression de plusieurs marqueurs de l'autophagie accompagnée, de façon paradoxale, d'un ralentissement du flux autophagique, évoque une question intrigante : dans les cellules différenciées, les autophagosomes seraient-ils utilisés dans un autre but que celui de la dégradation de composants cellulaires ? Avec le rôle de plus en plus reconnu de l'autophagie dans la sécrétion des protéines (Deretic et al., 2012) et avec la notion d'autophagosomes sécrétoires (Bruns et al., 2011), il est tout à fait envisageable qu'un événement lié à la différenciation cellulaire puisse faire pencher l'autophagie vers la sécrétion plus que vers la dégradation. Ainsi, même si nous avons démontré l'absence d'implication directe de l'autophagie dans le trafic non conventionnel du rotavirus, le rôle de l'autophagie dans l'activité sécrétoire des cellules intestinales au cours de la différenciation constitue une perspective de recherche particulièrement stimulante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ambrose, R.L., and Mackenzie, J.M. (2010). West Nile Virus Differentially Modulates the Unfolded Protein Response To Facilitate Replication and Immune Evasion. *J. Virol.* *85*, 2723–2732.
- Ameri, K., and Harris, A.L. (2008). Activating transcription factor 4. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 14–21.
- Andrei, C., Dazzi, C., Lotti, L., Torrisi, M.R., Chimini, G., and Rubartelli, A. (1999). The secretory route of the leaderless protein interleukin 1 β involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol. Biol. Cell* *10*, 1463–1475.
- Aoki, S.T., Settembre, E.C., Trask, S.D., Greenberg, H.B., Harrison, S.C., and Dormitzer, P.R. (2009). Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science* *324*, 1444–1447.
- Appenzeller-Herzog, C. (2005). Carbohydrate- and Conformation-dependent Cargo Capture for ER-Exit. *Mol. Biol. Cell* *16*, 1258–1267.
- Arnoldi, F., De Lorenzo, G., Mano, M., Schraner, E.M., Wild, P., Eichwald, C., and Burrone, O.R. (2014). Rotavirus Increases Levels of Lipidated LC3 Supporting Accumulation of Infectious Progeny Virus without Inducing Autophagosome Formation. *PLoS ONE* *9*, e95197.
- Au, K.S., Mattion, N.M., and Estes, M.K. (1993). A subviral particle binding domain on the rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *Virology* *194*, 665–673.
- Avezov, E., Frenkel, Z., Ehrlich, M., Herscovics, A., and Lederkremer, G.Z. (2008). Endoplasmic reticulum (ER) mannosidase I is compartmentalized and required for N-glycan trimming to Man5-6GlcNAc2 in glycoprotein ER-associated degradation. *Mol. Biol. Cell* *19*, 216–225.
- Awad, W., Estrada, I., Shen, Y., and Hendershot, L.M. (2008). BiP mutants that are unable to interact with endoplasmic reticulum DnaJ proteins provide insights into interdomain interactions in BiP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 1164–1169.
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* *182*, 685–701.
- Axten, J.M., Medina, J.R., Feng, Y., Shu, A., Romeril, S.P., Grant, S.W., Li, W.H.H., Heerding, D.A., Minthorn, E., Mencken, T., et al. (2012). Discovery of 7-methyl-5-(1-([3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). *J. Med. Chem.* *55*, 7193–7207.
- Baas, A.F., Kuipers, J., van der Wel, N.N., Battle, E., Koerten, H.K., Peters, P.J., and Clevers, H.C. (2004). Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell* *116*, 457–466.
- Bachert, C., and Linstedt, A.D. (2010). Dual Anchoring of the GRASP Membrane Tether Promotes trans Pairing. *J. Biol. Chem.* *285*, 16294–16301.
- Barlowe, C. (2003). Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol.* *13*, 295–300.
- Barr, F.A., Puype, M., Vandekerckhove, J., and Warren, G. (1997). GRASP65, a Protein Involved in the Stacking of Golgi Cisternae. *Cell* *91*, 253–262.
- Belden, W.J., and Barlowe, C. (2001). Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles. *Science* *294*, 1528–1531.
- Bennett, S.M., Jiang, M., and Imperiale, M.J. (2013). Role of cell-type-specific endoplasmic reticulum-associated degradation in polyomavirus trafficking. *J. Virol.* *87*, 8843–8852.
- Benyair, R., Ron, E., and Lederkremer, G.Z. (2011). Chapter Five - Protein Quality Control, Retention, and Degradation at the Endoplasmic Reticulum. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, Kwang W. Jeon, ed. (Academic Press), pp. 197–280.
- Berkova, Z., Crawford, S.E., Trugnan, G., Yoshimori, T., Morris, A.P., and Estes, M.K. (2006). Rotavirus NSP4 Induces a Novel Vesicular Compartment Regulated by Calcium and Associated with Viroplasms. *J. Virol.* *80*, 6061–6071.

- Bernales, S., McDonald, K.L., and Walter, P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol.* 4, e423.
- Bernales, S., Schuck, S., and Walter, P. (2007). ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum. *Autophagy* 3, 285–287.
- Bernasconi, R., Soldà, T., Galli, C., Pertel, T., Luban, J., and Molinari, M. (2010). Cyclosporine A-sensitive, cyclophilin B-dependent endoplasmic reticulum-associated degradation. *PloS One* 5.
- Bernasconi, R., Galli, C., Noack, J., Bianchi, S., de Haan, C.A.M., Reggiori, F., and Molinari, M. (2012). Role of the SEL1L:LC3-I complex as an ERAD tuning receptor in the mammalian ER. *Mol. Cell* 46, 809–819.
- Berois, M., Sapin, C., Erk, I., Poncet, D., and Cohen, J. (2003). Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *J. Virol.* 77, 1757–1763.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2, 326–332.
- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H., and Ruck, B.J. (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2, 1281–1283.
- Blanchet, F.P., Moris, A., Nikolic, D.S., Lehmann, M., Cardinaud, S., Stalder, R., Garcia, E., Dinkins, C., Leuba, F., and Wu, L. (2010). Human Immunodeficiency Virus-1 Inhibition of Immunoamphisomes in Dendritic Cells Impairs Early Innate and Adaptive Immune Responses. *Immunity* 32, 654–669.
- Blond-Elguindi, S., Cwirla, S.E., Dower, W.J., Lipshutz, R.J., Sprang, S.R., Sambrook, J.F., and Gething, M.J. (1993). Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell* 75, 717–728.
- Boshuizen, J.A., Reimerink, J.H.J., Korteland-van Male, A.M., van Ham, V.J.J., Bouma, J., Gerwig, G.J., Koopmans, M.P.G., Büller, H.A., Dekker, J., and Einerhand, A.W.C. (2005). Homeostasis and function of goblet cells during rotavirus infection in mice. *Virology* 337, 210–221.
- Boya, P., Reggiori, F., and Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat. Cell Biol.* 15, 713–720.
- Boyce, M., Bryant, K.F., Jousse, C., Long, K., Harding, H.P., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ma, D., Coen, D.M., Ron, D., et al. (2005). A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307, 935–939.
- Broquet, A.H., Lenoir, C., Gardet, A., Sapin, C., Chwetzoff, S., Jouniaux, A.-M., Lopez, S., Trugnan, G., Bachelet, M., and Thomas, G. (2006). Hsp70 Negatively Controls Rotavirus Protein Bioavailability in Caco-2 Cells Infected by the Rotavirus RF Strain. *J. Virol.* 81, 1297–1304.
- Browne, E.P., Bellamy, A.R., and Taylor, J.A. (2000). Membrane-destabilizing activity of rotavirus NSP4 is mediated by a membrane-proximal amphipathic domain. *J. Gen. Virol.* 81, 1955–1959.
- Bruns, C., McCaffery, J.M., Curwin, A.J., Duran, J.M., and Malhotra, V. (2011). Biogenesis of a novel compartment for autophagosome-mediated unconventional protein secretion. *J. Cell Biol.* 195, 979–992.
- Buchberger, A. (2014). ERQC Autophagy: Yet Another Way to Die. *Mol. Cell* 54, 3–4.
- Bukau, B., Weissman, J., and Horwich, A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125, 443–451.
- Burns, J.W., Greenberg, H.B., Shaw, R.D., and Estes, M.K. (1988). Functional and topographical analyses of epitopes on the hemagglutinin (VP4) of the simian rotavirus SA11. *J. Virol.* 62, 2164–2172.
- Calì, T., Galli, C., Olivari, S., and Molinari, M. (2008). Segregation and rapid turnover of EDEM1 by an autophagy-like mechanism modulates standard ERAD and folding activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 405–410.
- Caramelo, J.J., Castro, O.A., Alonso, L.G., de Prat-Gay, G., and Parodi, A.J. (2003). UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible

- hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 86–91.
- Carvalho, P., Goder, V., and Rapoport, T.A. (2006). Distinct Ubiquitin-Ligase Complexes Define Convergent Pathways for the Degradation of ER Proteins. *Cell* **126**, 361–373.
- Carvalho, P., Stanley, A.M., and Rapoport, T.A. (2010). Retrotranslocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p. *Cell* **143**, 579–591.
- Cebollero, E., Reggiori, F., and Kraft, C. (2012). Reticulophagy and Ribophagy: Regulated Degradation of Protein Production Factories. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, 1–9.
- Chang, H.C., Samaniego, F., Nair, B.C., Buonaguro, L., and Ensoli, B. (1997). HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. *AIDS Lond. Engl.* **11**, 1421–1431.
- Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M.G., and Zweibaum, A. (1988). Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res.* **48**, 1936–1942.
- Charpilienne, A., Abad, M.J., Michelangeli, F., Alvarado, F., Vasseur, M., Cohen, J., and Ruiz, M.C. (1997). Solubilized and cleaved VP7, the outer glycoprotein of rotavirus, induces permeabilization of cell membrane vesicles. *J. Gen. Virol.* **78**, 1367–1371.
- Chavan, M., and Lennarz, W. (2006). The molecular basis of coupling of translocation and N-glycosylation. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 17–20.
- Chemello, M.E., Aristimuno, O.C., Michelangeli, F., and Ruiz, M.-C. (2002). Requirement for Vacuolar H⁺-ATPase Activity and Ca²⁺ Gradient during Entry of Rotavirus into MA104 Cells. *J. Virol.* **76**, 13083–13087.
- Chen, D., Luongo, C.L., Nibert, M.L., and Patton, J.T. (1999). Rotavirus Open Cores Catalyze 5' - Capping and Methylation of Exogenous RNA: Evidence That VP3 Is a Methyltransferase. *Virology* **265**, 120–130.
- Chen, D., Chen, X., Li, M., Zhang, H., Ding, W.-X., and Yin, X.-M. (2013). CCCP-Induced LC3 lipidation depends on Atg9 whereas FIP200/Atg13 and Beclin 1/Atg14 are dispensable. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **432**, 226–230.
- Chen, J.Z., Settembre, E.C., Aoki, S.T., Zhang, X., Bellamy, A.R., Dormitzer, P.R., Harrison, S.C., and Grigorieff, N. (2009). Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 10644–10648.
- Cheng, G., Feng, Z., and He, B. (2005). Herpes Simplex Virus 1 Infection Activates the Endoplasmic Reticulum Resident Kinase PERK and Mediates eIF-2 Dephosphorylation by the 134.5 Protein. *J. Virol.* **79**, 1379–1388.
- Cheong, H., Lindsten, T., Wu, J., Lu, C., and Thompson, C.B. (2011). Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 11121–11126.
- Chichili, G.R., and Rodgers, W. (2009). Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2319–2328.
- Christianson, J.C., Shaler, T.A., Tyler, R.E., and Kopito, R.R. (2008). OS-9 and GRP94 deliver mutant α 1-antitrypsin to the Hrd1[?]SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat. Cell Biol.* **10**, 272–282.
- Clarke, M.L., Lockett, L.J., and Both, G.W. (1995). Membrane binding and endoplasmic reticulum retention sequences of rotavirus VP7 are distinct: role of carboxy-terminal and other residues in membrane binding. *J. Virol.* **69**, 6473–6478.
- Codogno, P., Mehrpour, M., and Proikas-Cezanne, T. (2012). Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 7–12.
- Contin, R., Arnoldi, F., Campagna, M., and Burrone, O.R. (2010). Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. *J. Gen. Virol.* **91**, 1782–1793.
- Cooper, D.N., and Barondes, S.H. (1990). Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J. Cell Biol.* **110**, 1681–1691.
- Cormier, J.H., Tamura, T., Sunryd, J.C., and Hebert, D.N. (2009). EDEM1 recognition and delivery of misfolded proteins to the SEL1L-containing ERAD complex. *Mol. Cell* **34**, 627–633.

- Corradetti, M.N., Inoki, K., Bardeesy, N., DePinho, R.A., and Guan, K.-L. (2004). Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev.* 18, 1533–1538.
- Crawford, S.E., Mukherjee, S.K., Estes, M.K., Lawton, J.A., Shaw, A.L., Ramig, R.F., and Prasad, B.V.V. (2001). Trypsin Cleavage Stabilizes the Rotavirus VP4 Spike. *J. Virol.* 75, 6052–6061.
- Crawford, S.E., Hyser, J.M., Utama, B., and Estes, M.K. (2012). Autophagy hijacked through viroporin-activated calcium/calmodulin-dependent kinase kinase- signaling is required for rotavirus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E3405–E3413.
- Credle, J.J., Finer-Moore, J.S., Papa, F.R., Stroud, R.M., and Walter, P. (2005). On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18773–18784.
- Cross, B.C.S., Bond, P.J., Sadowski, P.G., Jha, B.K., Zak, J., Goodman, J.M., Silverman, R.H., Neubert, T.A., Baxendale, I.R., Ron, D., et al. (2012). The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E869–878.
- Cuadras, M.A., Bordier, B.B., Zambrano, J.L., Ludert, J.E., and Greenberg, H.B. (2006). Dissecting Rotavirus Particle-Raft Interaction with Small Interfering RNAs: Insights into Rotavirus Transit through the Secretory Pathway. *J. Virol.* 80, 3935–3946.
- Cullinan, S.B., and Diehl, J.A. (2006). Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 317–332.
- Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., and Diehl, J.A. (2003). Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7198–7209.
- D'Angelo, G., Prencipe, L., Iodice, L., Beznoussenko, G., Savarese, M., Marra, P., Di Tullio, G., Martire, G., De Matteis, M.A., and Bonatti, S. (2009). GRASP65 and GRASP55 Sequentially Promote the Transport of C-terminal Valine-bearing Cargos to and through the Golgi Complex. *J. Biol. Chem.* 284, 34849–34860.
- Darling, N.J., and Cook, S.J. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*
- Davidson, G.P., Goller, I., Bishop, R.F., Townley, R.R., Holmes, I.H., and Ruck, B.J. (1975). Immunofluorescence in duodenal mucosa of children with acute enteritis due to a new virus. *J. Clin. Pathol.* 28, 263.
- Déctor, M.A., Romero, P., López, S., and Arias, C.F. (2002). Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep.* 3, 1175–1180.
- Delmas, O., Durand-Schneider, A.-M., Cohen, J., Colard, O., and Trugnan, G. (2004). Spike Protein VP4 Assembly with Maturing Rotavirus Requires a Postendoplasmic Reticulum Event in Polarized Caco-2 Cells. *J. Virol.* 78, 10987–10994.
- Deng, J., Lu, P.D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Sonenberg, N., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10161–10168.
- Deretic, V., Jiang, S., and Dupont, N. (2012). Autophagy intersections with conventional and unconventional secretion in tissue development, remodeling and inflammation. *Trends Cell Biol.* 22, 397–406.
- Díaz, Y., Peña, F., Aristimuño, O.C., Matteo, L., De Agrela, M., Chemello, M.E., Michelangeli, F., and Ruiz, M.C. (2012). Dissecting the Ca²⁺ entry pathways induced by rotavirus infection and NSP4-EGFP expression in Cos-7 cells. *Virus Res.* 167, 285–296.
- Díaz-Troya, S., Pérez-Pérez, M.E., Florencio, F.J., and Crespo, J.L. (2008). The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* 4, 851–865.
- Dice, J.F. (2007). Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 3, 295–299.
- Dobson, C.M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* 426, 884–890.
- Dong, M., Bridges, J.P., Apsley, K., Xu, Y., and Weaver, T.E. (2008). ERdj4 and ERdj5 are required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation of misfolded surfactant protein C. *Mol. Biol. Cell* 19, 2620–2630.

- Dong, Y., Zeng, C.Q.-Y., Ball, J.M., Estes, M.K., and Morris, A.P. (1997). The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 3960.
- Dormitzer, P.R., Greenberg, H.B., and Harrison, S.C. (2001). Proteolysis of Monomeric Recombinant Rotavirus VP4 Yields an Oligomeric VP5* Core. *J. Virol.* *75*, 7339–7350.
- Dormitzer, P.R., Sun, Z.-Y.J., Wagner, G., and Harrison, S.C. (2002). The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J.* *21*, 885–897.
- Dormitzer, P.R., Nason, E.B., Venkataram Prasad, B.V., and Harrison, S.C. (2004). Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* *430*, 1053–1058.
- Dragovic, Z., Broadley, S.A., Shomura, Y., Bracher, A., and Hartl, F.U. (2006). Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO J.* *25*, 2519–2528.
- Dupont, N., Jiang, S., Pilli, M., Ornatowski, W., Bhattacharya, D., and Deretic, V. (2011). Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β : Autophagy-based unconventional secretory pathway. *EMBO J.* *30*, 4701–4711.
- Duran, J.M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W.F., and Malhotra, V. (2010). Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J. Cell Biol.* *188*, 527–536.
- DuRose, J.B. (2006). Intrinsic Capacities of Molecular Sensors of the Unfolded Protein Response to Sense Alternate Forms of Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Biol. Cell* *17*, 3095–3107.
- Ebert, A.D., Laussmann, M., Wegehingel, S., Kaderali, L., Erfle, H., Reichert, J., Lechner, J., Beer, H.-D., Pepperkok, R., and Nickel, W. (2010). Tec-kinase-mediated phosphorylation of fibroblast growth factor 2 is essential for unconventional secretion. *Traffic Cph. Den.* *11*, 813–826.
- Eletto, D., Dersh, D., and Argon, Y. (2010). GRP94 in ER quality control and stress responses. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 479–485.
- Eletto, D., Maganty, A., Eletto, D., Dersh, D., Makarewich, C., Biswas, C., Paton, J.C., Paton, A.W., Doroudgar, S., Glembotski, C.C., et al. (2012). Limitation of individual folding resources in the ER leads to outcomes distinct from the unfolded protein response. *J. Cell Sci.* *125*, 4865–4875.
- Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 181–191.
- English, L., Chemali, M., Duron, J., Rondeau, C., Laplante, A., Gingras, D., Alexander, D., Leib, D., Norbury, C., Lippé, R., et al. (2009). Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat. Immunol.* *10*, 480–487.
- Eskelinen, E.-L. (2005). Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* *1*, 1–10.
- Estes, M.K. Estes MK, Kapikian AZ (2007) Rotaviruses. In Fields Virology, Knipe DM, Howley PM (eds) 5th edn, pp 1918–1974. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.
- Estes, M.K., Graham, D.Y., and Mason, B.B. (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.* *39*, 879–888.
- Estrozi, L.F., and Navaza, J. (2010). Ab initio high-resolution single-particle 3D reconstructions: The symmetry adapted functions way. *J. Struct. Biol.* *172*, 253–260.
- Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F., and Burrone, O.R. (1999). Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J. Gen. Virol.* *80*, 333–339.
- Fanning, A.S., Jameson, B.J., Jesaitis, L.A., and Anderson, J.M. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* *273*, 29745–29753.
- Feng, Z., Zhang, H., Levine, A.J., and Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 8204–8209.

- Flewett, T.H., Bryden, A.S., and Davies, H. (1975). Letter: Virus diarrhoea in foals and other animals. *Vet. Rec.* 96, JMM.
- Flynn, G.C., Pohl, J., Flocco, M.T., and Rothman, J.E. (1991). Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 353, 726–730.
- Fourn, V.L., Gaplovska-Kysela, K., Guhl, B., Santimaria, R., Zuber, C., and Roth, J. (2009). Basal autophagy is involved in the degradation of the ERAD component EDEM1. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1434–1445.
- Le Fourn, V., Park, S., Jang, I., Gaplovska-Kysela, K., Guhl, B., Lee, Y., Cho, J.W., Zuber, C., and Roth, J. (2013). Large protein complexes retained in the ER are dislocated by non-COPII vesicles and degraded by selective autophagy. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 1985–2002.
- Frenkel, Z., Gregory, W., Kornfeld, S., and Lederkremer, G.Z. (2003). Endoplasmic reticulum-associated degradation of mammalian glycoproteins involves sugar chain trimming to Man6-5GlcNAc2. *J. Biol. Chem.* 278, 34119–34124.
- Frenkel, Z., Shenkman, M., Kondratyev, M., and Lederkremer, G.Z. (2004). Separate roles and different routing of calnexin and ERp57 in endoplasmic reticulum quality control revealed by interactions with asialoglycoprotein receptor chains. *Mol. Biol. Cell* 15, 2133–2142.
- Fujioka, Y., Noda, N.N., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2010). Dimeric Coiled-coil Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Atg16 and Its Functional Significance in Autophagy. *J. Biol. Chem.* 285, 1508–1515.
- Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol. Biol. Cell* 19, 2092–2100.
- Gammoh, N., Florey, O., Overholtzer, M., and Jiang, X. (2012). Interaction between FIP200 and ATG16L1 distinguishes ULK1 complex-dependent and -independent autophagy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 144–149.
- Gardet, A., Breton, M., Fontanges, P., Trugnan, G., and Chwetzoff, S. (2006). Rotavirus Spike Protein VP4 Binds to and Remodels Actin Bundles of the Epithelial Brush Border into Actin Bodies. *J. Virol.* 80, 3947–3956.
- Gardet, A., Breton, M., Trugnan, G., and Chwetzoff, S. (2007). Role for actin in the polarized release of rotavirus. *J. Virol.* 81, 4892–4894.
- Gardner, B.M., and Walter, P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* 333, 1891–1894.
- Gardner, B.M., Pincus, D., Gotthardt, K., Gallagher, C.M., and Walter, P. (2013). Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a013169.
- Ge, L., Melville, D., Zhang, M., and Schekman, R. (2013). The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *eLife* 2, e00947.
- Gee, H.Y., Noh, S.H., Tang, B.L., Kim, K.H., and Lee, M.G. (2011). Rescue of $\Delta F508$ -CFTR Trafficking via a GRASP-Dependent Unconventional Secretion Pathway. *Cell* 146, 746–760.
- Geiger, R., Andrichke, D., Friebe, S., Herzog, F., Luisoni, S., Heger, T., and Helenius, A. (2011). BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Nat. Cell Biol.* 13, 1305–1314.
- Geng, J., and Klionsky, D.J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. “Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects” Review Series. *EMBO Rep.* 9, 859–864.
- Gidalevitz, T., Stevens, F., and Argon, Y. (2013). Orchestration of secretory protein folding by ER chaperones. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 2410–2424.
- Giuliani, F., Grieve, A., and Rabouille, C. (2011). Unconventional secretion: a stress on GRASP. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 498–504.
- Glass, R.I., and Parashar, U.D. (2006). The Promise of New Rotavirus Vaccines. *N. Engl. J. Med.* 354, 75–77.

- Goldwater, P.N., Rowland, K., Thesinger, M., Abbott, K., Grieve, A., Palombo, E.A., Masendycz, P.J., Wilkinson, I., and Bear, J. (2001). Rotavirus encephalopathy: pathogenesis reviewed. *J. Paediatr. Child Health* 37, 206–209.
- González, R.A., Espinosa, R., Romero, P., López, S., and Arias, C.F. (2000). Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch. Virol.* 145, 1963–1973.
- Groisman, B., Shenkman, M., Ron, E., and Lederkremer, G.Z. (2011). Mannose trimming is required for delivery of a glycoprotein from EDEM1 to XTP3-B and to late endoplasmic reticulum-associated degradation steps. *J. Biol. Chem.* 286, 1292–1300.
- Groulx, J.-F., Khalfaoui, T., Benoit, Y.D., Bernatchez, G., Carrier, J.C., Basora, N., and Beaulieu, J.-F. (2012). Autophagy is active in normal colon mucosa. *Autophagy* 8, 893–902.
- Grove, D.E., Fan, C.-Y., Ren, H.Y., and Cyr, D.M. (2011). The endoplasmic reticulum-associated Hsp40 DNAJB12 and Hsc70 cooperate to facilitate RMA1 E3-dependent degradation of nascent CFTR Δ F508. *Mol. Biol. Cell* 22, 301–314.
- Guérin-Danan, C., Meslin, J.C., Chambard, A., Charpilienne, A., Relano, P., Bouley, C., Cohen, J., and Andrieux, C. (2001). Food supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* DN-114 001 protects suckling rats from rotavirus-associated diarrhea. *J. Nutr.* 131, 111–117.
- Gutierrez, M., Isa, P., Sanchez-San Martin, C., Perez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C.F., and Lopez, S. (2010). Different Rotavirus Strains Enter MA104 Cells through Different Endocytic Pathways: the Role of Clathrin-Mediated Endocytosis. *J. Virol.* 84, 9161–9169.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 30, 214–226.
- Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., and Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141, 656–667.
- Halasz, P., Holloway, G., and Coulson, B.S. (2010). Death mechanisms in epithelial cells following rotavirus infection, exposure to inactivated rotavirus or genome transfection. *J. Gen. Virol.* 91, 2007–2018.
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., et al. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 495, 389–393.
- Hammond, A.T., and Glick, B.S. (2000). Dynamics of Transitional Endoplasmic Reticulum Sites in Vertebrate Cells. *Mol. Biol. Cell* 11, 3013.
- Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., and Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 37298–37302.
- Hardie, D.G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *J. Cell Sci.* 117, 5479–5487.
- Harding, H.P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271–274.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* 6, 1099–1108.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Mol. Cell* 11, 619–633.
- Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., and Hardie, D.G. (1996). Characterization of the AMP-activated Protein Kinase Kinase from Rat Liver and Identification of Threonine 172 as the Major Site at Which It Phosphorylates AMP-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 27879–27887.

- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1433–1437.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* *10*, 3787–3799.
- He, B. (2006). Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ.* *13*, 393–403.
- Hetz, C., and Glimcher, L.H. (2009). Fine-Tuning of the Unfolded Protein Response: Assembling the IRE1 α Interactome. *Mol. Cell* *35*, 551–561.
- Hetz, C., Chevet, E., and Harding, H.P. (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 703–719.
- Higa, A., Taouji, S., Lhomond, S., Jensen, D., Fernandez-Zapico, M.E., Simpson, J.C., Pasquet, J.-M., Schekman, R., and Chevet, E. (2014). Endoplasmic reticulum stress-activated transcription factor ATF6 α requires the disulfide isomerase PDIA5 to modulate chemoresistance. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 1839–1849.
- Hirao, K., Natsuka, Y., Tamura, T., Wada, I., Morito, D., Natsuka, S., Romero, P., Sleno, B., Tremblay, L.O., Herscovics, A., et al. (2006). EDEM3, a Soluble EDEM Homolog, Enhances Glycoprotein Endoplasmic Reticulum-associated Degradation and Mannose Trimming. *J. Biol. Chem.* *281*, 9650–9658.
- Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., and Weissman, J.S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J. Cell Biol.* *186*, 323–331.
- Holloway, G., and Coulson, B.S. (2006). Rotavirus activates JNK and p38 signaling pathways in intestinal cells, leading to AP-1-driven transcriptional responses and enhanced virus replication. *J. Virol.* *80*, 10624–10633.
- Hong, M., Luo, S., Baumeister, P., Huang, J.-M., Gogia, R.K., Li, M., and Lee, A.S. (2004). Underglycosylation of ATF6 as a Novel Sensing Mechanism for Activation of the Unfolded Protein Response. *J. Biol. Chem.* *279*, 11354–11363.
- Hori, O., Ichinoda, F., Yamaguchi, A., Tamatani, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Katayama, T., Tohyama, M., Stern, D.M., Ozawa, K., et al. (2004). Role of Herp in the endoplasmic reticulum stress response. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *9*, 457–469.
- Hosokawa, N., Wada, I., Hasegawa, K., Yorihozi, T., Tremblay, L.O., Herscovics, A., and Nagata, K. (2001). A novel ER α -mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep.* *2*, 415–422.
- Hosokawa, N., Tremblay, L.O., You, Z., Herscovics, A., Wada, I., and Nagata, K. (2003). Enhancement of endoplasmic reticulum (ER) degradation of misfolded Null Hong Kong α 1-antitrypsin by human ER mannosidase I. *J. Biol. Chem.* *278*, 26287–26294.
- Hosokawa, N., Wada, I., Nagasawa, K., Moriyama, T., Okawa, K., and Nagata, K. (2008). Human XTP3-B Forms an Endoplasmic Reticulum Quality Control Scaffold with the HRD1-SEL1L Ubiquitin Ligase Complex and BiP. *J. Biol. Chem.* *283*, 20914–20924.
- Hosokawa, N., Kamiya, Y., Kamiya, D., Kato, K., and Nagata, K. (2009a). Human OS-9, a Lectin Required for Glycoprotein Endoplasmic Reticulum-associated Degradation, Recognizes Mannose-trimmed N-Glycans. *J. Biol. Chem.* *284*, 17061–17068.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., and Yamada, N. (2009b). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1981–1991.
- Hosokawa, N., Tremblay, L.O., Sleno, B., Kamiya, Y., Wada, I., Nagata, K., Kato, K., and Herscovics, A. (2010). EDEM1 accelerates the trimming of α 1,2-linked mannose on the C branch of N-glycans. *Glycobiology* *20*, 567–575.
- Houck, S.A., Ren, H.Y., Madden, V.J., Bonner, J.N., Conlin, M.P., Janovick, J.A., Conn, P.M., and Cyr, D.M. (2014). Quality Control Autophagy Degrades Soluble ERAD-Resistant Conformers of the Misfolded Membrane Protein GnRHR. *Mol. Cell* *54*, 166–179.

- Houri, J.J., Ogierdenis, E., Trugnan, G., and Codogno, P. (1993). Autophagic Degradation of N-Linked Glycoproteins Is Downregulated in Differentiated Human Colon Adenocarcinoma Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 805–811.
- Høyer-Hansen, M., and Jäättelä, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ.* 14, 1576–1582.
- Hughes, R.C. (1999). Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1473, 172–185.
- Hyser, J.M., Collinson-Pautz, M.R., Utama, B., and Estes, M.K. (2010). Rotavirus Disrupts Calcium Homeostasis by NSP4 Viroporin Activity. *mBio* 1, e00265–10–e00265–20.
- Hyser, J.M., Utama, B., Crawford, S.E., Broughman, J.R., and Estes, M.K. (2013). Activation of the Endoplasmic Reticulum Calcium Sensor STIM1 and Store-Operated Calcium Entry by Rotavirus Requires NSP4 Viroporin Activity. *J. Virol.* 87, 13579–13588.
- Iida, Y., Fujimori, T., Okawa, K., Nagata, K., Wada, I., and Hosokawa, N. (2011). SEL1L protein critically determines the stability of the HRD1-SEL1L endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) complex to optimize the degradation kinetics of ERAD substrates. *J. Biol. Chem.* 286, 16929–16939.
- Imai, M., Akatani, K., Ikegami, N., and Furuichi, Y. (1983). Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J. Virol.* 47, 125–136.
- Inoue, T., and Tsai, B. (2011). A Large and Intact Viral Particle Penetrates the Endoplasmic Reticulum Membrane to Reach the Cytosol. *PLoS Pathog.* 7, e1002037.
- Isler, J.A., Skalet, A.H., and Alwine, J.C. (2005). Human Cytomegalovirus Infection Activates and Regulates the Unfolded Protein Response. *J. Virol.* 79, 6890–6899.
- Itakura, E., and Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* 6, 764–776.
- Jackson, W.T., Giddings, T.H., Taylor, M.P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R.R., and Kirkegaard, K. (2005). Subversion of Cellular Autophagosomal Machinery by RNA Viruses. *PLoS Biol.* 3, e156.
- Jao, C.C., Ragusa, M.J., Stanley, R.E., and Hurley, J.H. (2013). A HORMA domain in Atg13 mediates PI 3-kinase recruitment in autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 5486–5491.
- Jessop, C.E., Watkins, R.H., Simmons, J.J., Tasab, M., and Bulleid, N.J. (2009). Protein disulphide isomerase family members show distinct substrate specificity: P5 is targeted to BiP client proteins. *J. Cell Sci.* 122, 4287–4295.
- Jin, Y., Zhuang, M., and Hendershot, L.M. (2009). ERdj3, a Luminal ER DnaJ Homologue, Binds Directly to Unfolded Proteins in the Mammalian ER: Identification of Critical Residues †. *Biochemistry (Mosc.)* 48, 41–49.
- Johansen, T., and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7, 279–296.
- Jordan, T.X., and Randall, G. (2012). Manipulation or capitulation: virus interactions with autophagy. *Microbes Infect.* 14, 126–139.
- Jourdan, N., Maurice, M., Delautier, D., Quero, A.M., Servin, A.L., and Trugnan, G. (1997). Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J. Virol.* 71, 8268–8278.
- Jousse, C. (2003). Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2 phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. *J. Cell Biol.* 163, 767–775.
- Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* 20, 1992–2003.
- Kabeya, Y. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720–5728.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell Sci.* 117, 2805–2812.

- Kamhi-Nesher, S., Shenkman, M., Tolchinsky, S., Fromm, S.V., Ehrlich, R., and Lederkremer, G.Z. (2001). A Novel Quality Control Compartment Derived from the Endoplasmic Reticulum. *Mol. Biol. Cell* 12, 1711–1723.
- Kamimoto, T., Shoji, S., Hidvegi, T., Mizushima, N., Umebayashi, K., Perlmutter, D.H., and Yoshimori, T. (2006). Intracellular inclusions containing mutant alpha1-antitrypsin Z are propagated in the absence of autophagic activity. *J. Biol. Chem.* 281, 4467–4476.
- Kamiya, Y., Kamiya, D., Yamamoto, K., Nyfeler, B., Hauri, H.-P., and Kato, K. (2008). Molecular Basis of Sugar Recognition by the Human L-type Lectins ERGIC-53, VIPL, and VIP36. *J. Biol. Chem.* 283, 1857–1861.
- Kaneko, M., Niinuma, Y., and Nomura, Y. (2003). Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 931–935.
- Karanasios, E., Stapleton, E., Manifava, M., Kaizuka, T., Mizushima, N., Walker, S.A., and Ktistakis, N.T. (2013). Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J. Cell Sci.* 126, 5224–5238.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P., and Guan, K.-L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* 10, 935–945.
- Kim, I.S., Trask, S.D., Babyonyshev, M., Dormitzer, P.R., and Harrison, S.C. (2010). Effect of mutations in VP5 hydrophobic loops on rotavirus cell entry. *J. Virol.* 84, 6200–6207.
- Kimata, Y., Oikawa, D., Shimizu, Y., Ishiwata-Kimata, Y., and Kohno, K. (2004). A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *J. Cell Biol.* 167, 445–456.
- Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Ito, T., Hirata, A., Suzuki, T., Oikawa, D., Takeuchi, M., and Kohno, K. (2007). Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *J. Cell Biol.* 179, 75–86.
- Kinseth, M.A., Anjard, C., Fuller, D., Guizzunti, G., Loomis, W.F., and Malhotra, V. (2007). The Golgi-Associated Protein GRASP Is Required for Unconventional Protein Secretion during Development. *Cell* 130, 524–534.
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Formation Process of Autophagosome Is Traced with Apg8/Aut7p in Yeast. *J. Cell Biol.* 147, 435–446.
- Klionsky, D.J., and Codogno, P. (2013). The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J. Innate Immun.* 5, 427–433.
- Kondratyev, M., Avezov, E., Shenkman, M., Groisman, B., and Lederkremer, G.Z. (2007). PERK-dependent compartmentalization of ERAD and unfolded protein response machineries during ER stress. *Exp. Cell Res.* 313, 3395–3407.
- Kordasti, S., Sjövall, H., Lundgren, O., and Svensson, L. (2004). Serotonin and vasoactive intestinal peptide antagonists attenuate rotavirus diarrhoea. *Gut* 53, 952–957.
- Kostova, Z., Tsai, Y.C., and Weissman, A.M. (2007). Ubiquitin ligases, critical mediators of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18, 770–779.
- Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., and Momoi, T. (2007). ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* 14, 230–239.
- Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the Integrated Stress Response. *Mol. Cell* 40, 280–293.
- Kruse, K.B. (2005). Characterization of an ERAD Gene as VPS30/ATG6 Reveals Two Alternative and Functionally Distinct Protein Quality Control Pathways: One for Soluble Z Variant of Human -1 Proteinase Inhibitor (A1PiZ) and Another for Aggregates of A1PiZ. *Mol. Biol. Cell* 17, 203–212.
- Kruse, K.B., Dear, A., Kaltenbrun, E.R., Crum, B.E., George, P.M., Brennan, S.O., and McCracken, A.A. (2006). Mutant Fibrinogen Cleared from the Endoplasmic Reticulum via Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation and Autophagy: An Explanation for Liver Disease. *Am. J. Pathol.* 168, 1299–1308.

- Kuchler, K., Sterne, R.E., and Thorner, J. (1989). *Saccharomyces cerevisiae* STE6 gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *EMBO J.* **8**, 3973–3984.
- Kuo, A. (2000). Transmembrane transforming growth factor- α tethers to the PDZ domain-containing, Golgi membrane-associated protein p59/GRASP55. *EMBO J.* **19**, 6427–6439.
- Kwak, M.-K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., and Kensler, T.W. (2003). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J. Biol. Chem.* **278**, 8135–8145.
- Kyei, G.B., Dinkins, C., Davis, A.S., Roberts, E., Singh, S.B., Dong, C., Wu, L., Kominami, E., Ueno, T., Yamamoto, A., et al. (2009). Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J. Cell Biol.* **186**, 255–268.
- Lamb, C.A., Yoshimori, T., and Tooze, S.A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 759–774.
- Lee, A.-H., Scapa, E.F., Cohen, D.E., and Glimcher, L.H. (2008). Regulation of Hepatic Lipogenesis by the Transcription Factor XBP1. *Science* **320**, 1492–1496.
- Lee, J.-S., Li, Q., Lee, J.-Y., Lee, S.-H., Jeong, J.H., Lee, H.-R., Chang, H., Zhou, F.-C., Gao, S.-J., Liang, C., et al. (2009). FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1355–1362.
- Lee, S., Hur, E., Ryoo, I., Jung, K.-A., Kwak, J., and Kwak, M.-K. (2012). Involvement of the Nrf2-proteasome pathway in the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic β -cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **264**, 431–438.
- Leitman, J., Ron, E., Ogen-Shtern, N., and Lederkremer, G.Z. (2013). Compartmentalization of endoplasmic reticulum quality control and ER-associated degradation factors. *DNA Cell Biol.* **32**, 2–7.
- Leitman, J., Shenkman, M., Gofman, Y., Shtern, N.O., Ben-Tal, N., Hendershot, L.M., and Lederkremer, G.Z. (2014). Herp coordinates compartmentalization and recruitment of HRD1 and misfolded proteins for ERAD. *Mol. Biol. Cell* **25**, 1050–1060.
- Levi, S.K., and Glick, B.S. (2007). GRASping Unconventional Secretion. *Cell* **130**, 407–409.
- Levine, B. (2005). Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* **120**, 159–162.
- Li, F., and Vierstra, R.D. (2012). Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci.* **17**, 526–537.
- Li, J., Liu, Y., Wang, Z., Liu, K., Wang, Y., Liu, J., Ding, H., and Yuan, Z. (2011). Subversion of Cellular Autophagy Machinery by Hepatitis B Virus for Viral Envelopment. *J. Virol.* **85**, 6319–6333.
- Li, W., Manktelow, E., von Kirchbach, J.C., Gog, J.R., Desselberger, U., and Lever, A.M. (2010). Genomic analysis of codon, sequence and structural conservation with selective biochemical-structure mapping reveals highly conserved and dynamic structures in rotavirus RNAs with potential cis-acting functions. *Nucleic Acids Res.* **38**, 7718–7735.
- Liang, C., Lee, J., Inn, K.-S., Gack, M.U., Li, Q., Roberts, E.A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., et al. (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat. Cell Biol.* **10**, 776–787.
- Libersou, S., Siebert, X., Ouldali, M., Estrozi, L.F., Navaza, J., Charpilienne, A., Garnier, P., Poncet, D., and Lepault, J. (2008). Geometric mismatches within the concentric layers of rotavirus particles: a potential regulatory switch of viral particle transcription activity. *J. Virol.* **82**, 2844–2852.
- Lilley, B.N., and Ploegh, H.L. (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* **429**, 834–840.
- Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., LaVail, M.M., and Walter, P. (2007). IRE1 Signaling Affects Cell Fate During the Unfolded Protein Response. *Science* **318**, 944–949.
- López, S., and Arias, C.F. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* **12**, 271–278.

- Lu, P.D. (2004). Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol.* 167, 27–33.
- Lu, X., McDonald, S.M., Tortorici, M.A., Tao, Y.J., Vasquez-Del Carpio, R., Nibert, M.L., Patton, J.T., and Harrison, S.C. (2008). Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Struct. Lond. Engl.* 1993 16, 1678–1688.
- Ludert, J.E., Michelangeli, F., Gil, F., Liprandi, F., and Esparza, J. (1987). Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology* 27, 95–101.
- Luo, S., Mao, C., Lee, B., and Lee, A.S. (2006). GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5688–5697.
- Ma, Y., and Hendershot, L.M. (2003). Delineation of a Negative Feedback Regulatory Loop That Controls Protein Translation during Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Biol. Chem.* 278, 34864–34873.
- Ma, Y., and Hendershot, L.M. (2004). Herp Is Dually Regulated by Both the Endoplasmic Reticulum Stress-specific Branch of the Unfolded Protein Response and a Branch That Is Shared with Other Cellular Stress Pathways. *J. Biol. Chem.* 279, 13792–13799.
- Ma, K., Vatter, K.M., and Wek, R.C. (2002). Dimerization and Release of Molecular Chaperone Inhibition Facilitate Activation of Eukaryotic Initiation Factor-2 Kinase in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Biol. Chem.* 277, 18728–18735.
- Määttä, P., Gehring, K., Bergeron, J.J.M., and Thomas, D.Y. (2010). Protein quality control in the ER: The recognition of misfolded proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 500–511.
- Maeda, K., Fujihara, M., and Harasawa, R. (2009). Bovine viral diarrhea virus 2 infection activates the unfolded protein response in MDBK cells, leading to apoptosis. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 71, 801–805.
- Majerowicz, S., Kubelka, C.F., Stephens, P., and Barth, O.M. (1994). Ultrastructural study on experimental infection of rotavirus in a murine heterologous model. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89, 395–402.
- Malhotra, V. (2013). Unconventional protein secretion: an evolving mechanism. *EMBO J.* 32, 1660–1664.
- Mancias, J.D., and Goldberg, J. (2008). Structural basis of cargo membrane protein discrimination by the human COPII coat machinery. *EMBO J.* 27, 2918–2928.
- Mangus, D.A., Evans, M.C., and Jacobson, A. (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol.* 4, 223.
- Manjithaya, R., Anjard, C., Loomis, W.F., and Subramani, S. (2010). Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. *J. Cell Biol.* 188, 537–546.
- Margariti, A., Li, H., Chen, T., Martin, D., Vizcay-Barrena, G., Alam, S., Karamariti, E., Xiao, Q., Zampetaki, A., Zhang, Z., et al. (2013). XBP1 mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through BECLIN-1 transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 288, 859–872.
- Maruri-Avidal, L., Lopez, S., and Arias, C.F. (2008). Endoplasmic Reticulum Chaperones Are Involved in the Morphogenesis of Rotavirus Infectious Particles. *J. Virol.* 82, 5368–5380.
- Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B.V., Cohen, J., and Rey, F.A. (2001). Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *EMBO J.* 20, 1485–1497.
- Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N.T., Izumi, T., Noda, T., and Yoshimori, T. (2010). Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J. Cell Biol.* 190, 511–521.
- Mattion, N.M., Mitchell, D.B., Both, G.W., and Estes, M.K. (1991). Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology* 181, 295–304.
- Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J., and Gerlo, S. (2014). Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem. Sci.* 39, 245–254.

- Mauthe, M., Jacob, A., Freiburger, S., Hentschel, K., Stierhof, Y.-D., Codogno, P., and Proikas-Cezanne, T. (2011). Resveratrol-mediated autophagy requires WIPI-1-regulated LC3 lipidation in the absence of induced phagophore formation. *Autophagy* 7, 1448–1461.
- Mayer, M.P., and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 670–684.
- McClain, B., Settembre, E., Temple, B.R.S., Bellamy, A.R., and Harrison, S.C. (2010). X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 397, 587–599.
- McCrae, M.A., and McCorquodale, J.G. (1983). Molecular biology of rotaviruses. V. Terminal structure of viral RNA species. *Virology* 126, 204–212.
- Mebus, C.A., Rhodes, M.B., and Underdahl, N.R. (1978). Neonatal calf diarrhea caused by a virus that induces villous epithelial cell syncytia. *Am. J. Vet. Res.* 39, 1223–1228.
- Meer, G. van, and Lisman, Q. (2002). Sphingolipid Transport: Rafts and Translocators. *J. Biol. Chem.* 277, 25855–25858.
- Mehul, B., and Hughes, R.C. (1997). Plasma membrane targeting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 10), 1169–1178.
- Merulla, J., Fasana, E., Soldà, T., and Molinari, M. (2013). Specificity and regulation of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *Traffic Cph. Den.* 14, 767–777.
- Michelangeli, F., Ruiz, M.C., del Castillo, J.R., Ludert, J.E., and Liprandi, F. (1991). Effect of rotavirus infection on intracellular calcium homeostasis in cultured cells. *Virology* 181, 520–527.
- Michelangeli, F., Liprandi, F., Chemello, M.E., Ciarlet, M., and Ruiz, M.C. (1995). Selective depletion of stored calcium by thapsigargin blocks rotavirus maturation but not the cytopathic effect. *J. Virol.* 69, 3838–3847.
- Mijaljica, D., Prescott, M., and Devenish, R.J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7, 673–682.
- Mirazimi, A., and Svensson, L. (1998). Carbohydrates Facilitate Correct Disulfide Bond Formation and Folding of Rotavirus VP7. *J. Virol.* 72, 3887.
- Mirazimi, A., and Svensson, L. (2000). ATP is required for correct folding and disulfide bond formation of rotavirus VP7. *J. Virol.* 74, 8048–8052.
- Mirazimi, A., von Bonsdorff, C.H., and Svensson, L. (1996). Effect of brefeldin A on rotavirus assembly and oligosaccharide processing. *Virology* 217, 554–563.
- Mirazimi, A., Nilsson, M., and Svensson, L. (1998). The molecular chaperone calnexin interacts with the NSP4 enterotoxin of rotavirus in vivo and in vitro. *J. Virol.* 72, 8705–8709.
- Mizushima, N. (2010). The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 132–139.
- Mizushima, N., and Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat. Cell Biol.* 12, 823–830.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhi, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 152, 657–668.
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* 116, 1679–1688.
- Moreau, K., Renna, M., and Rubinsztein, D.C. (2013). Connections between SNAREs and autophagy. *Trends Biochem. Sci.* 38, 57–63.
- Morris, A.P., Scott, J.K., Ball, J.M., Zeng, C.Q.-Y., O'Neal, W.K., and Estes, M.K. (1999). NSP4 elicits age-dependent diarrhea and Ca²⁺-mediated I⁻ influx into intestinal crypts of CF mice. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 277, G431–G444.
- Musalem, C., and Espejo, R.T. (1985). Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11. *J. Gen. Virol.* 66 (Pt 12), 2715–2724.

- Nadanaka, S., Yoshida, H., Kano, F., Murata, M., and Mori, K. (2004). Activation of mammalian unfolded protein response is compatible with the quality control system operating in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 15, 2537–2548.
- Nadanaka, S., Okada, T., Yoshida, H., and Mori, K. (2007). Role of Disulfide Bridges Formed in the Luminal Domain of ATF6 in Sensing Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1027–1043.
- Nakatogawa, H., Ichimura, Y., and Ohsumi, Y. (2007). Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 130, 165–178.
- Nath, S., Dancourt, J., Shteyn, V., Puente, G., Fong, W.M., Nag, S., Bewersdorf, J., Yamamoto, A., Antonny, B., and Melia, T.J. (2014). Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. *Nat. Cell Biol.* 16, 415–424.
- Nguyen, D.T. (2004). Nck-dependent Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase-1 and Regulation of Cell Survival during Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Biol. Cell* 15, 4248–4260.
- Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2009). Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* 461, 654–658.
- Nishimura, T., Kaizuka, T., Cadwell, K., Sahani, M.H., Saitoh, T., Akira, S., Virgin, H.W., and Mizushima, N. (2013). FIP200 regulates targeting of Atg16L1 to the isolation membrane. *EMBO Rep.* 14, 284–291.
- Noda, N.N., Fujioka, Y., Hanada, T., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2012). Structure of the Atg12–Atg5 conjugate reveals a platform for stimulating Atg8–PE conjugation. *EMBO Rep.* 14, 206–211.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., and Ron, D. (2001). Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J. Cell Biol.* 153, 1011–1022.
- Nufer, O., Mitrovic, S., and Hauri, H.-P. (2003). Profile-based data base scanning for animal L-type lectins and characterization of VIPL, a novel VIP36-like endoplasmic reticulum protein. *J. Biol. Chem.* 278, 15886–15896.
- O'Brien, J.A., Taylor, J.A., and Bellamy, A.R. (2000). Probing the Structure of Rotavirus NSP4: a Short Sequence at the Extreme C Terminus Mediates Binding to the Inner Capsid Particle. *J. Virol.* 74, 5388.
- Oda, Y. (2006). Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J. Cell Biol.* 172, 383–393.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., et al. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.* 26, 9220–9231.
- Ogier-Denis, E., Codogno, P., Chantret, I., and Trugnan, G. (1988). The processing of asparagine-linked oligosaccharides in HT-29 cells is a function of their state of enterocytic differentiation. An accumulation of Man9,8-GlcNAc2-Asn species is indicative of an impaired N-glycan trimming in undifferentiated cells. *J. Biol. Chem.* 263, 6031–6037.
- Oikawa, D., Kimata, Y., Kohno, K., and Iwawaki, T. (2009). Activation of mammalian IRE1alpha upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. *Exp. Cell Res.* 315, 2496–2504.
- Oikawa, D., Tokuda, M., Hosoda, A., and Iwawaki, T. (2010). Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 alpha. *Nucleic Acids Res.* 38, 6265–6273.
- Oka, O.B.V., and Bulleid, N.J. (2013). Forming disulfides in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 2425–2429.
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A., and Kohno, K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 445–450.

- Okuda-Shimizu, Y., and Hendershot, L.M. (2007). Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp. *Mol. Cell* 28, 544–554.
- Oliver, J.D., Roderick, H.L., Llewellyn, D.H., and High, S. (1999). ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol. Biol. Cell* 10, 2573–2582.
- Oral, O., Oz-Arslan, D., Itah, Z., Naghavi, A., Deveci, R., Karacali, S., and Gozuacik, D. (2012). Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 17, 810–820.
- Orsi, A., Razi, M., Dooley, H.C., Robinson, D., Weston, A.E., Collinson, L.M., and Tooze, S.A. (2012). Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* 23, 1860–1873.
- Orvedahl, A., Alexander, D., Tallóczy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, D.A., and Levine, B. (2007). HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* 1, 23–35.
- Ostrovsky, O., Makarewich, C.A., Snapp, E.L., and Argon, Y. (2009). An essential role for ATP binding and hydrolysis in the chaperone activity of GRP94 in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 11600–11605.
- Otero, J.H., Lizák, B., and Hendershot, L.M. (2010). Life and death of a BiP substrate. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 472–478.
- Oyadomari, S., and Mori, M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 11, 381–389.
- Palam, L.R., Baird, T.D., and Wek, R.C. (2011). Phosphorylation of eIF2 Facilitates Ribosomal Bypass of an Inhibitory Upstream ORF to Enhance CHOP Translation. *J. Biol. Chem.* 286, 10939–10949.
- Park, S., Jang, I., Zuber, C., Lee, Y., Cho, J.W., Matsuo, I., Ito, Y., and Roth, J. (2014). ERADication of EDEM1 occurs by selective autophagy and requires deglycosylation by cytoplasmic peptide N-glycanase. *Histochem. Cell Biol.*
- Patel, M.M., Steele, D., Gentsch, J.R., Wecker, J., Glass, R.I., and Parashar, U.D. (2011). Real-world impact of rotavirus vaccination. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 30, S1–5.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927–939.
- Patton, J.T. (1996). Rotavirus VP1 alone specifically binds to the 3' end of viral mRNA, but the interaction is not sufficient to initiate minus-strand synthesis. *J. Virol.* 70, 7940–7947.
- Pavio, N., Romano, P.R., Graczyk, T.M., Feinstone, S.M., and Taylor, D.R. (2003). Protein synthesis and endoplasmic reticulum stress can be modulated by the hepatitis C virus envelope protein E2 through the eukaryotic initiation factor 2α kinase PERK. *J. Virol.* 77, 3578–3585.
- Pena, J., and Harris, E. (2011). Dengue Virus Modulates the Unfolded Protein Response in a Time-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* 286, 14226–14236.
- Pérez, J.F., Chemello, M.E., Liprandi, F., Ruiz, M.C., and Michelangeli, F. (1998). Oncosis in MA104 cells is induced by rotavirus infection through an increase in intracellular Ca²⁺ concentration. *Virology* 252, 17–27.
- Petrie, B.L., Graham, D.Y., Hanssen, H., and Estes, M.K. (1982). Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunocytochemistry. *J. Gen. Virol.* 63, 457–467.
- Petrie, B.L., Greenberg, H.B., Graham, D.Y., and Estes, M.K. (1984). Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Res.* 1, 133–152.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J., and Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA - binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* 17, 5811–5821.
- Piron, M., Delaunay, T., Grosclaude, J., and Poncet, D. (1999). Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4G1-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *J. Virol.* 73, 5411–5421.

- Plempner, R.K., Böhmeler, S., Bordallo, J., Sommer, T., and Wolf, D.H. (1997). Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* 388, 891–895.
- Ploegh, H.L. (2007). A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* 448, 435–438.
- Polson, H.E.J., de Lartigue, J., Rigden, D.J., Reedijk, M., Urbé, S., Clague, M.J., and Tooze, S.A. (2010). Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* 6, 506–522.
- Poncet, D., Laurent, S., and Cohen, J. (1994). Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO J.* 13, 4165–4173.
- Poruchynsky, M.S., and Atkinson, P.H. (1991). Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *J. Virol.* 65, 4720.
- Prasad, B.V., Rothnagel, R., Zeng, C.Q., Jakana, J., Lawton, J.A., Chiu, W., and Estes, M.K. (1996). Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* 382, 471–473.
- Prasad, B.V.V., Burns, J.W., Marietta, E., Estes, M.K., and Chiu, W. (1990). Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature* 343, 476–479.
- Proikas-Cezanne, T., Waddell, S., Gaugel, A., Frickey, T., Lupas, A., and Nordheim, A. (2004). WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. *Oncogene* 23, 9314–9325.
- Proud, C.G. (2005). eIF2 and the control of cell physiology. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 3–12.
- Prudovsky, I., Bagala, C., Tarantini, F., Mandinova, A., Soldi, R., Bellum, S., and Maciag, T. (2002). The intracellular translocation of the components of the fibroblast growth factor 1 release complex precedes their assembly prior to export. *J. Cell Biol.* 158, 201–208.
- Puri, C., Renna, M., Bento, C.F., Moreau, K., and Rubinsztein, D.C. (2013). Diverse Autophagosome Membrane Sources Coalesce in Recycling Endosomes. *Cell* 154, 1285–1299.
- Qian, Z., Xuan, B., Chapa, T.J., Gualberto, N., and Yu, D. (2012). Murine Cytomegalovirus Targets Transcription Factor ATF4 To Exploit the Unfolded-Protein Response. *J. Virol.* 86, 6712–6723.
- Rabinovich, E., Kerem, A., Fröhlich, K.-U., Diamant, N., and Bar-Nun, S. (2002). AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 626–634.
- Ramig, R.F. (2004). Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *J. Virol.* 78, 10213–10220.
- Reggiori, F., Monastyrskaya, I., Verheije, M.H., Calì, T., Ulasli, M., Bianchi, S., Bernasconi, R., de Haan, C.A.M., and Molinari, M. (2010). Coronaviruses Hijack the LC3-I-Positive EDEMosomes, ER-Derived Vesicles Exporting Short-Lived ERAD Regulators, for Replication. *Cell Host Microbe* 7, 500–508.
- Ri, M., Tashiro, E., Oikawa, D., Shinjo, S., Tokuda, M., Yokouchi, Y., Narita, T., Masaki, A., Ito, A., Ding, J., et al. (2012). Identification of Toyocamycin, an agent cytotoxic for multiple myeloma cells, as a potent inhibitor of ER stress-induced XBP1 mRNA splicing. *Blood Cancer J.* 2, e79.
- Rodriguez Boulan, E., and Sabatini, D.D. (1978). Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 5071–5075.
- Rodriguez-Boulan, E., and Mûsch, A. (2005). Protein sorting in the Golgi complex: Shifting paradigms. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1744, 455–464.
- Rojas, M., Arias, C.F., and Lopez, S. (2010). Protein Kinase R Is Responsible for the Phosphorylation of eIF2 in Rotavirus Infection. *J. Virol.* 84, 10457–10466.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529.

- Ron, E., Shenkman, M., Groisman, B., Izenshtein, Y., Leitman, J., and Lederkremer, G.Z. (2011). Bypass of glycan-dependent glycoprotein delivery to ERAD by up-regulated EDEM1. *Mol. Biol. Cell* 22, 3945–3954.
- Rouschop, K.M.A., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., et al. (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J. Clin. Invest.* 120, 127–141.
- Rüegsegger, U., Leber, J.H., and Walter, P. (2001). Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell* 107, 103–114.
- Ruiz, M.C., Cohen, J., and Michelangeli, F. (2000). Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium* 28, 137–149.
- Ruiz, M.C., Díaz, Y., Peña, F., Aristimuño, O.C., Chemello, M.E., and Michelangeli, F. (2005). Ca²⁺ permeability of the plasma membrane induced by rotavirus infection in cultured cells is inhibited by tunicamycin and brefeldin A. *Virology* 333, 54–65.
- Ruiz, M.C., Aristimuño, O.C., Díaz, Y., Peña, F., Chemello, M.E., Rojas, H., Ludert, J.E., and Michelangeli, F. (2007). Intracellular disassembly of infectious rotavirus particles by depletion of Ca²⁺ sequestered in the endoplasmic reticulum at the end of virus cycle. *Virus Res.* 130, 140–150.
- Rutkevich, L.A., Cohen-Doyle, M.F., Brockmeier, U., and Williams, D.B. (2010). Functional relationship between protein disulfide isomerase family members during the oxidative folding of human secretory proteins. *Mol. Biol. Cell* 21, 3093–3105.
- Rutkowski, D.T., Arnold, S.M., Miller, C.N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K.M., Mori, K., Sadighi Akha, A.A., Raden, D., and Kaufman, R.J. (2006). Adaptation to ER Stress Is Mediated by Differential Stabilities of Pro-Survival and Pro-Apoptotic mRNAs and Proteins. *PLoS Biol.* 4, e374.
- Salim, A.F., Phillips, A.D., Walker-Smith, J.A., and Farthing, M.J. (1995). Sequential changes in small intestinal structure and function during rotavirus infection in neonatal rats. *Gut* 36, 231–238.
- Sanchez-San Martin, C., Lopez, T., Arias, C.F., and Lopez, S. (2004). Characterization of Rotavirus Cell Entry. *J. Virol.* 78, 2310–2318.
- Sano, R., and Reed, J.C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 3460–3470.
- Sapin, C., Colard, O., Delmas, O., Tessier, C., Breton, M., Enouf, V., Chwetzoff, S., Ouanich, J., Cohen, J., Wolf, C., et al. (2002). Rafts Promote Assembly and Atypical Targeting of a Nonenveloped Virus, Rotavirus, in Caco-2 Cells. *J. Virol.* 76, 4591–4602.
- Scarlatti, F., Maffei, R., Beau, I., Codogno, P., and Ghidoni, R. (2008). Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ.* 15, 1318–1329.
- Schotman, H., Karhinen, L., and Rabouille, C. (2008). dGRASP-Mediated Noncanonical Integrin Secretion Is Required for Drosophila Epithelial Remodeling. *Dev. Cell* 14, 171–182.
- Sen, A., Sen, N., and Mackow, E.R. (2007). The formation of viroplasm-like structures by the rotavirus NSP5 protein is calcium regulated and directed by a C-terminal helical domain. *J. Virol.* 81, 11758–11767.
- Sengupta, D., Truschel, S., Bachert, C., and Linstedt, A.D. (2009). Organelle tethering by a homotypic PDZ interaction underlies formation of the Golgi membrane network. *J. Cell Biol.* 186, 41–55.
- Settembre, E.C., Chen, J.Z., Dormitzer, P.R., Grigorieff, N., and Harrison, S.C. (2011). Atomic model of an infectious rotavirus particle: Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO J.* 30, 408–416.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3, 99–111.
- Shibutani, S.T., and Yoshimori, T. (2014). A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res.* 24, 58–68.

- Shomura, Y., Dragovic, Z., Chang, H.-C., Tzvetkov, N., Young, J.C., Brodsky, J.L., Guerriero, V., Hartl, F.U., and Bracher, A. (2005). Regulation of Hsp70 function by HspBP1: structural analysis reveals an alternate mechanism for Hsp70 nucleotide exchange. *Mol. Cell* 17, 367–379.
- Short, B., Preisinger, C., Korner, R., Kopajtich, R., Byron, O., and Barr, F.A. (2001). A GRASP55-rab2 effector complex linking Golgi structure to membrane traffic. *J. Cell Biol.* 155, 877–884.
- Shorter, J. (1999). GRASP55, a second mammalian GRASP protein involved in the stacking of Golgi cisternae in a cell-free system. *EMBO J.* 18, 4949–4960.
- Silva-Ayala, D., López, T., Gutiérrez, M., Perrimon, N., López, S., and Arias, C.F. (2013). Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 10270–10275.
- Silvestri, L.S., Taraporewala, Z.F., and Patton, J.T. (2004). Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *J. Virol.* 78, 7763–7774.
- Sinha, S., Colbert, C.L., Becker, N., Wei, Y., and Levine, B. (2008). Molecular basis of the regulation of Beclin 1-dependent autophagy by the gamma-herpesvirus 68 Bcl-2 homolog M11. *Autophagy* 4, 989–997.
- Sir, D., Chen, W., Choi, J., Wakita, T., Yen, T.S.B., and Ou, J.J. (2008). Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology* 48, 1054–1061.
- Snodgrass, D.R., Ferguson, A., Allan, F., Angus, K.W., and Mitchell, B. (1979). Small intestinal morphology and epithelial cell kinetics in lamb rotavirus infections. *Gastroenterology* 76, 477–481.
- Sörgjerd, K., Ghafouri, B., Jonsson, B.-H., Kelly, J.W., Blond, S.Y., and Hammarström, P. (2006). Retention of misfolded mutant transthyretin by the chaperone BiP/GRP78 mitigates amyloidogenesis. *J. Mol. Biol.* 356, 469–482.
- Sousa, M.C., Ferrero-Garcia, M.A., and Parodi, A.J. (1992). Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry (Mosc.)* 31, 97–105.
- Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., and Brewer, J.W. (2004). XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 167, 35–41.
- Sriburi, R., Bommiasamy, H., Buldak, G.L., Robbins, G.R., Frank, M., Jackowski, S., and Brewer, J.W. (2007). Coordinate Regulation of Phospholipid Biosynthesis and Secretory Pathway Gene Expression in XBP-1(S)-induced Endoplasmic Reticulum Biogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 7024–7034.
- Stanley, P. (2011). Golgi Glycosylation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a005199–a005199.
- Stirzaker, S.C., and Both, G.W. (1989). The signal peptide of the rotavirus glycoprotein VP7 is essential for its retention in the ER as an integral membrane protein. *Cell* 56, 741–747.
- Strating, J.R.P.M., and Martens, G.J.M. (2009). The p24 family and selective transport processes at the ER—Golgi interface. *Biol. Cell* 101, 495–509.
- Su, H.-L., Liao, C.-L., and Lin, Y.-L. (2002). Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response. *J. Virol.* 76, 4162–4171.
- Svensson, L., Finlay, B.B., Bass, D., Bonsdorff, C.H. von, and Greenberg, H.B. (1991). Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J. Virol.* 65, 4190.
- Svensson, L., Dormitzer, P.R., von Bonsdorff, C.H., Maunula, L., and Greenberg, H.B. (1994). Intracellular manipulation of disulfide bond formation in rotavirus proteins during assembly. *J. Virol.* 68, 5204–5215.
- Szatmári, Z., and Sass, M. (2014). The autophagic roles of Rab small GTPases and their upstream regulators: A review. *Autophagy* 10, 1–13.
- Szul, T., and Sztul, E. (2011). COPII and COPI Traffic at the ER-Golgi Interface. *Physiology* 26, 348–364.

- Tam, A.B., Mercado, E.L., Hoffmann, A., and Niwa, M. (2012). ER Stress Activates NF- κ B by Integrating Functions of Basal IKK Activity, IRE1 and PERK. *PLoS ONE* 7, e45078.
- Tang, H.-Y., Huang, C.-H., Zhuang, Y.-H., Christianson, J.C., and Chen, X. (2014). EDEM2 and OS-9 Are Required for ER-Associated Degradation of Non-Glycosylated Sonic Hedgehog. *PLoS ONE* 9, e92164.
- Tanida, I., Sou, Y., Ezaki, J., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., and Kominami, E. (2004). HsAtg4B/HsApg4B/Autophagin-1 Cleaves the Carboxyl Termini of Three Human Atg8 Homologues and Delipidates Microtubule-associated Protein Light Chain 3- and GABAA Receptor-associated Protein-Phospholipid Conjugates. *J. Biol. Chem.* 279, 36268–36276.
- Taouji, S., Wolf, S., and Chevet, E. (2013). Oligomerization in Endoplasmic Reticulum Stress Signaling. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Elsevier), pp. 465–484.
- Taraporewala, Z.F., and Patton, J.T. (2001). Identification and Characterization of the Helix-Destabilizing Activity of Rotavirus Nonstructural Protein NSP2. *J. Virol.* 75, 4519–4527.
- Taraporewala, Z., Chen, D., and Patton, J.T. (1999). Multimers Formed by the Rotavirus Nonstructural Protein NSP2 Bind to RNA and Have Nucleoside Triphosphatase Activity. *J. Virol.* 73, 9934.
- Tardif, K.D. (2004). Hepatitis C Virus Suppresses the IRE1-XBP1 Pathway of the Unfolded Protein Response. *J. Biol. Chem.* 279, 17158–17164.
- Tate, J.E., Burton, A.H., Boschi-Pinto, C., Steele, A.D., Duque, J., and Parashar, U.D. (2012). 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 12, 136–141.
- Taylor, M.P., and Kirkegaard, K. (2007). Modification of Cellular Autophagy Protein LC3 by Poliovirus. *J. Virol.* 81, 12543–12553.
- Teckman, J.H., and Perlmutter, D.H. (2000). Retention of mutant α 1-antitrypsin Z in endoplasmic reticulum is associated with an autophagic response. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G961–G974.
- Tirasophon, W., Welihinda, A.A., and Kaufman, R.J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* 12, 1812–1824.
- Tooze, S.A., and Yoshimori, T. (2010). The origin of the autophagosomal membrane. *Nat. Cell Biol.* 12, 831–835.
- Torres-Medina, A., and Underdahl, N.R. (1980). Scanning electron microscopy of intestine of gnotobiotic piglets infected with porcine rotavirus. *Can. J. Comp. Med. Rev. Can. Médecine Comparée* 44, 403–411.
- Trask, S.D., and Dormitzer, P.R. (2006). Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. *J. Virol.* 80, 11293–11304.
- Trask, S.D., McDonald, S.M., and Patton, J.T. (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 165–177.
- Tremblay, L.O., and Herscovics, A. (1999). Cloning and expression of a specific human alpha 1,2-mannosidase that trims Man9GlcNAc2 to Man8GlcNAc2 isomer B during N-glycan biosynthesis. *Glycobiology* 9, 1073–1078.
- Trugnan, G., Ogier-Denis, E., Sapin, C., Darmoul, D., Bauvy, C., Aubery, M., and Codogno, P. (1991). The N-glycan processing in HT-29 cells is a function of their state of enterocytic differentiation. Evidence for an atypical traffic associated with change in polypeptide stability in undifferentiated HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* 266, 20849–20855.
- Trujillo-Alonso, V., Maruri-Avidal, L., Arias, C.F., and Lopez, S. (2011). Rotavirus Infection Induces the Unfolded Protein Response of the Cell and Controls It through the Nonstructural Protein NSP3. *J. Virol.* 85, 12594–12604.
- Tsaytler, P., Harding, H.P., Ron, D., and Bertolotti, A. (2011). Selective Inhibition of a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 Restores Proteostasis. *Science* 332, 91–94.

- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664–666.
- Valenzuela, S., Pizarro, J., Sandino, A.M., Vásquez, M., Fernández, J., Hernández, O., Patton, J., and Spencer, E. (1991). Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J. Virol.* 65, 3964–3967.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., and Bilanges, B. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 329–341.
- Vassilakos, A., Michalak, M., Lehrman, M.A., and Williams, D.B. (1998). Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry (Mosc.)* 37, 3480–3490.
- Vende, P., Tortorici, M.A., Taraporewala, Z.F., and Patton, J.T. (2003). Rotavirus NSP2 interferes with the core lattice protein VP2 in initiation of minus-strand synthesis. *Virology* 313, 261–273.
- Venditti, R., Wilson, C., and De Matteis, M.A. (2014). Exiting the ER: what we know and what we don't. *Trends Cell Biol.* 24, 9–18.
- Vinke, F.P., Grieve, A.G., and Rabouille, C. (2011). The multiple facets of the Golgi reassembly stacking proteins. *Biochem. J.* 433, 423–433.
- Wada, I., Imai, S., Kai, M., Sakane, F., and Kanoh, H. (1995). Chaperone function of calreticulin when expressed in the endoplasmic reticulum as the membrane-anchored and soluble forms. *J. Biol. Chem.* 270, 20298–20304.
- Wang, Y., Shen, J., Arenzana, N., Tirasophon, W., Kaufman, R.J., and Prywes, R. (2000). Activation of ATF6 and an ATF6 DNA Binding Site by the Endoplasmic Reticulum Stress Response. *J. Biol. Chem.* 275, 27013–27020.
- Ward, R.L. (1996). Mechanisms of protection against rotavirus in humans and mice. *J. Infect. Dis.* 174 Suppl 1, S51–58.
- Watson, P., Townley, A.K., Koka, P., Palmer, K.J., and Stephens, D.J. (2006). Sec16 Defines Endoplasmic Reticulum Exit Sites and is Required for Secretory Cargo Export in Mammalian Cells. *Traffic* 7, 1678–1687.
- Wegele, H., Wandinger, S.K., Schmid, A.B., Reinstein, J., and Buchner, J. (2006). Substrate transfer from the chaperone Hsp70 to Hsp90. *J. Mol. Biol.* 356, 802–811.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., and Levine, B. (2008). JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy. *Mol. Cell* 30, 678–688.
- Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., and Elazar, Z. (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J.* 29, 1792–1802.
- Woehlbier, U., and Hetz, C. (2011). Modulating stress responses by the UPRosome: A matter of life and death. *Trends Biochem. Sci.* 36, 329–337.
- Wolf, M., Deal, E.M., and Greenberg, H.B. (2012). Rhesus rotavirus trafficking during entry into MA104 cells is restricted to the early endosome compartment. *J. Virol.* 86, 4009–4013.
- Wong, J., Zhang, J., Si, X., Gao, G., Mao, I., McManus, B.M., and Luo, H. (2008). Autophagosome Supports Coxsackievirus B3 Replication in Host Cells. *J. Virol.* 82, 9143–9153.
- Xie, Z., Nair, U., and Klionsky, D.J. (2008). Atg8 Controls Phagophore Expansion during Autophagosome Formation. *Mol. Biol. Cell* 19, 3290–3298.
- Xu, A., Bellamy, A.R., and Taylor, J.A. (1998). BiP (GRP78) and endoplasmin (GRP94) are induced following rotavirus infection and bind transiently to an endoplasmic reticulum-localized virion component. *J. Virol.* 72, 9865–9872.
- Yamamoto, K., Yoshida, H., Kokame, K., Kaufman, R.J., and Mori, K. (2004). Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J. Biochem. (Tokyo)* 136, 343–350.
- Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2007). Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6 α and XBP1. *Dev. Cell* 13, 365–376.

- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 124–131.
- Ye, F., and Zhang, M. (2013). Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures. *Biochem. J.* 455, 1–14.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* 6, 1355–1364.
- Ye, Y., Shibata, Y., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E., and Rapoport, T.A. (2005). Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14132–14138.
- Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., and Tohyama, M. (2001). Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J. Biol. Chem.* 276, 13935–13940.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1998). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273, 33741–33749.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. (2000). ATF6 Activated by Proteolysis Binds in the Presence of NF-Y (CBF) Directly to the cis-Acting Element Responsible for the Mammalian Unfolded Protein Response. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6755.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001a). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881–891.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. (2001b). Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Formation of Transcription Factor Complex ERSF Including NF-Y (CBF) and Activating Transcription Factors 6 and 6 That Activates the Mammalian Unfolded Protein Response. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1239–1248.
- Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., and Mori, K. (2006). pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J. Cell Biol.* 172, 565–575.
- Young, A.R.J., Chan, E.Y.W., Hu, X.W., Köchl, R., Crawshaw, S.G., High, S., Hailey, D.W., Lippincott-Schwartz, J., and Tooze, S.A. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J. Cell Sci.* 119, 3888–3900.
- Yu, Z.-Q., Ni, T., Hong, B., Wang, H.-Y., Jiang, F.-J., Zou, S., Chen, Y., Zheng, X.-L., Klionsky, D.J., Liang, Y., et al. (2012). Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy* 8, 883–892.
- Zambrano, J.L., Ettayebi, K., Maaty, W.S., Faunce, N.R., Bothner, B., and Hardy, M.E. (2011). Rotavirus infection activates the UPR but modulates its activity. *Virol. J.* 8, 359.
- Zhang, M., and Schekman, R. (2013). Unconventional Secretion, Unconventional Solutions. *Science* 340, 559–561.
- Zhang, M., Zeng, C.Q.-Y., Morris, A.P., and Estes, M.K. (2000). A Functional NSP4 Enterotoxin Peptide Secreted from Rotavirus-Infected Cells. *J. Virol.* 74, 11663.
- Zhao, L., Rosales, C., Seburn, K., Ron, D., and Ackerman, S.L. (2010). Alteration of the unfolded protein response modifies neurodegeneration in a mouse model of Marinesco-Sjögren syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 19, 25–35.
- Zhou, J., Liu, C.Y., Back, S.H., Clark, R.L., Peisach, D., Xu, Z., and Kaufman, R.J. (2006). The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 14343–14348.
- Zsak, L., Lu, Z., Kutish, G.F., Neilan, J.G., and Rock, D.L. (1996). An African swine fever virus virulence-associated gene NL-S with similarity to the herpes simplex virus ICP34.5 gene. *J. Virol.* 70, 8865–8871.

Zuber, C., Cormier, J.H., Guhl, B., Santimaria, R., Hebert, D.N., and Roth, J. (2007). EDEM1 reveals a quality control vesicular transport pathway out of the endoplasmic reticulum not involving the COPII exit sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 4407–4412.

ANNEXES

Transfection of exogenous rotavirus rearranged RNA segments in cells infected with a WT rotavirus results in subsequent gene rearrangements

Sarah Duponchel,^{1,2†} Cécile Troupin,^{1,2‡} Lan Trang Vu,^{1,2}
Aurélien Schnuriger,^{1,2,3} Germain Trugnan^{1,2}
and Antoine Garbarg-Chenon^{1,2,3}

Correspondence

Antoine Garbarg-Chenon
a.chenon@trs.aphp.fr

¹Micro-Organismes, Molécules Bioactives et Physiopathologie Intestinale,
Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, Paris, France

²ERL U1157/UMR 7203, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, France

³Laboratoire de Virologie, Hôpital Armand Trousseau, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris,
Paris, France

Group A rotaviruses, members of the family *Reoviridae*, are a major cause of infantile acute gastroenteritis. The rotavirus genome consists of 11 dsRNA segments. In some cases, an RNA segment is replaced by a rearranged RNA segment, which is derived from its standard counterpart by partial sequence duplication. It has been shown that some rearranged segments are preferentially encapsidated into viral progenies after serial passages in cell culture. Based on this characteristic, a reverse genetics system was used previously to introduce exogenous segment 7 rearrangements into an infectious rotavirus. This study extends this reverse genetics system to RNA segments 5 and 11. Transfection of exogenous rotavirus rearranged RNA segment 5 or 11 into cells infected with a WT helper rotavirus (bovine strain RF) resulted in subsequent gene rearrangements in the viral progeny. Whilst recombinant viruses were rescued with an exogenous rearranged segment 11, the exogenous segment was modified by a secondary rearrangement. The occurrence of spontaneous rearrangements of WT or exogenous segments is a major hindrance to the use of this reverse genetics approach.

Received 11 March 2014

Accepted 3 June 2014

INTRODUCTION

Group A rotaviruses, members of the family *Reoviridae*, are a major cause of infantile viral gastroenteritis and are responsible for approximately 450 000 deaths each year (Estes & Kapikian, 2007; Tate *et al.*, 2012). Rotavirus genomes consist of 11 dsRNA segments, encoding six structural and six non-structural proteins (Estes & Kapikian, 2007). The 11 dsRNA segments can be separated by PAGE into a specific RNA profile called an electropherotype.

[†]Present address: Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL) INSERM U1052-Hepatitis viruses and related diseases, Lyon, France.

[‡]Present address: Dynamique des Lyssavirus et Adaptation à L'hôte, Département Infection et Épidémiologie, Institut Pasteur, Paris, France.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the sequences determined in this study are AF338245 for rearranged segment 11, KJ532803 and KJ532804 for rearranged segment 5 for rotavirus RF clone C1.17 and clone C2.22, respectively.

Three supplementary figures are available with the online version of this paper.

Development of a reverse genetics system is essential for advances in understanding the rotavirus replication cycle and its molecular pathogenesis. Attempts to develop a complete reverse genetics system for rotavirus to allow recovery of infectious recombinant viruses following transfection of the 11 positive RNA or cDNA segments have been unsuccessful (Richards *et al.*, 2013). Currently, only helper virus-dependent and gene-specific reverse genetics systems have been developed (Komoto *et al.*, 2006, 2008; Navarro *et al.*, 2013; Trask *et al.*, 2010; Troupin *et al.*, 2010).

The first reported reverse genetics system was based on the use of the human rotavirus KU as the helper virus and of segment 4 (encoding VP4) of simian rotavirus SA11 as the exogenous segment. The recombinant viruses containing the simian VP4 gene were recovered from cell culture using neutralizing antibodies targeting VP4 of the human virus to eliminate WT helper viruses (Komoto *et al.*, 2006). As neutralizing antibodies are needed to select recombinant viruses, this system is restricted to exogenous segments encoding surface antigenic proteins.

Another promising reverse genetics system was developed in 2010, in which two independent strategies were used to eliminate helper viruses and to recover recombinant viruses. In this system, simian rotavirus SA11 with a temperature-sensitive (*ts*) mutation in gene 8, encoding the NSP2 protein, was used as the helper virus, with WT gene 8 as the exogenous gene. Viruses were then propagated in cell culture at non-permissive temperatures, in conjunction with RNA interference-mediated degradation of *ts* NSP2 mRNA. Only recombinant viruses having incorporated WT exogenous gene 8 were recovered under this double selection pressure (Trask *et al.*, 2010).

The reverse genetics system described by Troupin *et al.* (2010) is based on the use of an exogenous rearranged RNA segment that replaces the homologous WT segment of the helper rotavirus. Gene rearrangement is a well-known phenomenon among rotaviruses (reviewed by Desselberger, 1996; Matthijnssens *et al.*, 2006). For some rotavirus strains, rearranged segments can replace standard-sized segments. Rotaviruses with a rearranged genome have been isolated from chronically infected immunocompromised youths (Bellinzoni *et al.*, 1987; Hundley *et al.*, 1987) and can be generated in cell culture by serial passages of rotavirus at high m.o.i. (Alam *et al.*, 2008; Hundley *et al.*, 1985; Kojima *et al.*, 2000; Méndez *et al.*, 1992; Patton *et al.*, 2001). In most cases, the rearrangement results from a partial head-to-tail duplication of the dsRNA segment: the sequence includes an unmodified 5' untranslated region (UTR) and ORF followed by a duplication of the 5' region, initiated at various positions after the stop codon and extending to the 3' end, resulting in a long 3' UTR (Desselberger, 1996).

In a previous study, rearranged segments 7 and 11 were found to be preferentially encapsidated into viral progeny after serial passages in cell culture (Troupin *et al.*, 2011). Considering these results, the reverse genetics system developed by Troupin *et al.* (2010) exploits the ability of rearranged segments to be maintained and amplified in the viral progeny without the need for any selective pressure other than selection inherent to cell culture. This system allowed the recovery of recombinant helper bovine rotaviruses having incorporated different forms of exogenous rearranged segment 7 (Troupin *et al.*, 2010).

As the development of a complete reverse genetics system for rotavirus remains unsuccessful, we decided to extend the reverse genetics system based on rearranged segments to RNA segments 5 and 11. These segments were chosen, as rearrangements of these two segments have been reported to occur frequently (Cao *et al.*, 2008; Kojima *et al.*, 2000; Patton *et al.*, 2001; Schnepf *et al.*, 2008) and because rearranged segment 11 has already been shown to be preferentially encapsidated into viral progeny (Troupin *et al.*, 2011).

Unexpectedly, the results showed that transfection of exogenous rotavirus rearranged RNA segment 5 or 11 into cells infected with a WT helper rotavirus resulted in subsequent gene rearrangements in the viral progeny.

Moreover, when an exogenous rearranged segment 11 was used, viruses with a secondary rearrangement of the exogenous RNA were recovered after passaging in MA-104 cell cultures.

RESULTS AND DISCUSSION

Our aim was to extend the reverse genetics system successfully used for rearranged segment 7 (Troupin *et al.*, 2010) to rearranged segments 5 (5R) and 11 (11R). Based on the hypothesis that rearranged segments are preferentially packaged into viruses, we expected that the use of segments 5R and 11R might promote the rescue of recombinant viruses with no selection pressure other than serial passage in culture. Plasmid constructs containing the rearranged sequences were used in reverse genetics experiments to provide exogenous segments. Point mutations were introduced into the cDNA sequences in order to distinguish between original and exogenous sequences. The helper virus was the bovine rotavirus RF, which contains WT non-rearranged segments. Empty pRiboz plasmid with no insert served as a control. All experiments were performed in duplicate. Reverse transcription (RT)-PCR and PAGE were used to detect potential recombinant viruses in the viral progeny produced over MA-104 serial passages of the RF helper virus.

Reverse genetics assays using 5R segments

Different constructions of 5R segments derived from the bovine rotavirus RF, which encodes a WT NSP1, were used in the reverse genetics experiments. Five different types of rearrangement were obtained from the cDNA of the original segment 5 cloned into the pRiboz plasmid (Fig. 1). Two rearrangements corresponded to the 5R segments of two infectious rotavirus RF clones C1.17 and C2.22. The three remaining rearranged segments contained various sizes of duplicated sequences, from full-length sequence duplication to a 600 bp duplication. In order to follow the exogenous rearranged segment, specific restriction sites were introduced into the 5R segments by site-directed mutagenesis. Due to sequence duplication in the rearranged segments, two identical mutations were obtained, one in the coding region and the other in the corresponding duplicated non-coding region. *MscI* restriction sites were generated by a T→C mutation at the nucleotide positions indicated in Fig. 1. To obtain viruses defective for NSP1, a construct (Δ NSP1) was generated for each 5R segment by deleting the first nucleotide of the ATG initiation codon (nt 33) of the NSP1 ORF. This mutation also suppressed the *NcoI* restriction site.

These constructs were then used in a reverse genetics assay to provide exogenous 5R segments. RNA profiles of the viruses obtained after reverse genetics experiments were visualized by PAGE every three passages in MA-104 cell culture (Fig. 2). Regardless of the 5R-containing plasmids used, the WT helper virus segment 5 was still visible at its

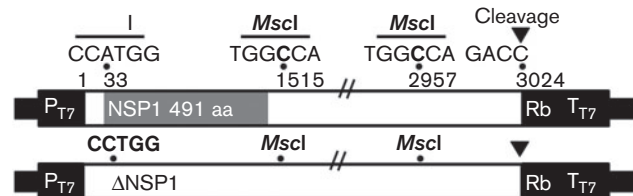
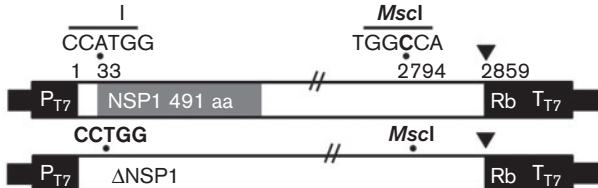
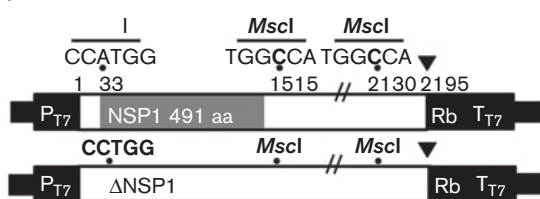
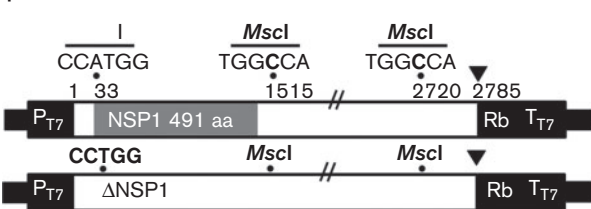
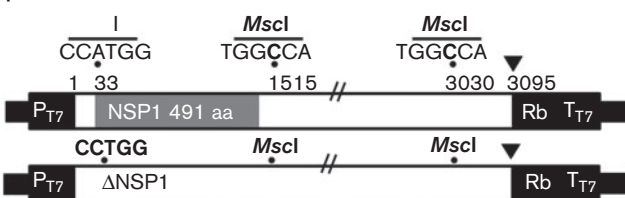
pRiboz5R-C2.22 and 5R-C2.22-ΔNSP1**pRiboz5R-C1.17 and 5R-C1.17-ΔNSP1****pRiboz5R-900 and 5R-900-ΔNSP1****pRiboz5R-310 and 5R-310-ΔNSP1****pRiboz5R-1 and 5R-1-ΔNSP1**

Fig. 1. Schematic representation of the pRiboz plasmids containing segment 5R cDNAs. The pRiboz constructs 5R-C2.22 (1526/84-1526), 5R-C1.17 (1455/176-1455), 5R-900 (1515/900-1515), 5R-310 (1515/310-1515) and 5R-1 (1515/1-1515) contain a different full-length 5R segment cDNA flanked by the polymerase T7 (T7pol) promoter (P_{T7}) and by the hepatitis delta virus ribozyme (Rb), followed by the T7pol terminator (T_{T7}). Numbers indicate the nucleotide position in the rearranged segment. Arrowheads indicate the ribozyme self-cleavage site; open boxes indicate the non-coding sequences, and shaded boxes indicate the NSP1-coding sequence. *MscI* restriction sites introduced by site-directed mutagenesis into the exogenous 5R segments are indicated. pRiboz5R-C2.22-ΔNSP1, pRiboz5R-C1.17-ΔNSP1, pRiboz-900-ΔNSP1, pRiboz5R-310-ΔNSP1 and pRiboz5R-1-ΔNSP1 are defective NSP1 derivatives generated from the corresponding plasmids by deletion of the A33

nucleotide, part of the ATG initiation codon of the NSP1 ORF. The A33 deletion is paired with the deletion of an *NcoI* restriction site.

usual position in the viral progeny and additional bands were present of different sizes (Fig. 2). In some cases, the additional band migrated at the same position as the exogenous 5R segment. In contrast, no additional bands were observed in the viral progeny generated from transfection of the control pRiboz plasmid and passaged under the same conditions in MA-104 cell culture.

Interestingly, rearranged forms of segment 5 were detected by RT-PCR in all the viral progeny generated from the transfection of 5R-containing plasmids, except for the

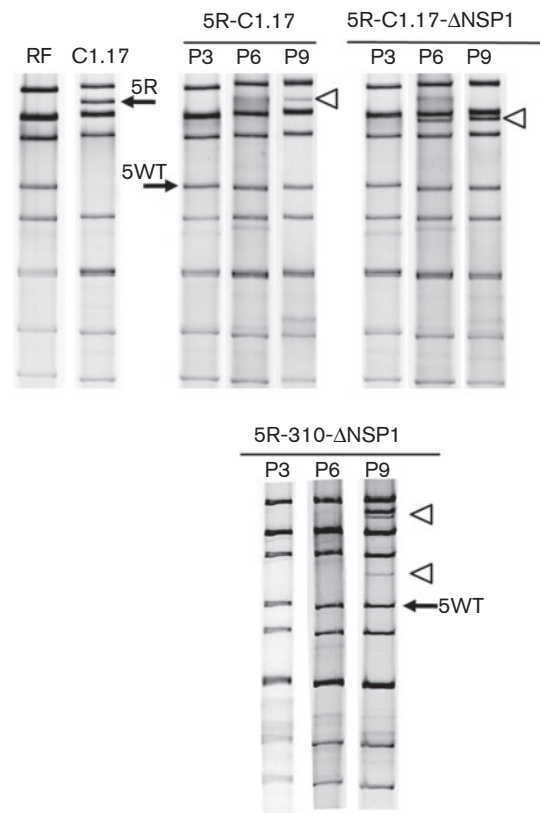


Fig. 2. RNA profiles of viral progeny obtained after transfection of pRiboz plasmids containing 5R segments. The RNA profiles of viral progeny obtained with 5R-C1.17, 5R-C1.17-ΔNSP1 and 5R-310-ΔNSP1 are shown as representative examples. Electropherotypes shown in the different lanes were produced from different PAGE experiments. P, passage number in MA-104 cell culture; RF, helper rotavirus RF containing a WT segment 5 (5WT); C1.17, rotavirus C1.17 containing a 5R segment. Black arrows indicate the localization of WT or 5R segments. Open arrowheads indicate additional bands, which might correspond to rearrangements of the helper rotavirus RF segment 5 further identified by sequence analysis.

control plasmid. Sequence analysis confirmed the presence of rearranged forms of segment 5, but their sequences did not match the exogenous rearranged sequences used in the reverse genetics assay. In particular, the *MscI* restriction site tagging the exogenous 5R sequences was never detected in the RNA sequence of the viral progeny. These results strongly suggested that, after transfection of a plasmid containing a 5R sequence, the WT segment 5 of the helper virus RF underwent spontaneous rearrangement during serial passages in MA-104 cell culture. Whether WT helper virus segment 5 spontaneous rearrangements were induced by the presence of the transfected, exogenous and rearranged segment remains to be established. However, it can be hypothesized that 5R segments generated from the WT helper virus might outcompete exogenous 5R segments, impeding their recovery in recombinant viruses.

Reverse genetics assays using the 11R segment

Attempts to broaden the reverse genetics system were then performed using the 11R segment derived from the previously described human rotavirus M4, which encodes WT NSP5 and NSP6 (Gault *et al.*, 2001).

Two different constructs were generated by site-directed mutagenesis from the cDNA of the original segment 11R inserted into the pRiboz plasmid (Fig. 3). In the pRiboz11R-*AatII* plasmid, segment 11R was mutated at nt 96 and 669 (A→G), generating two *AatII* restriction sites. In the pRiboz11R- Δ NSP6 plasmid, nt 101 and 674 were mutated (C→T), creating two *HpaI* restriction sites. The C→T mutation at nt 101 resulted in a silent mutation in the NSP5-coding sequence but generated an early stop codon in the NSP6-coding sequence. As a result, the putative NSP6 protein was reduced from 92 to 7 aa, generating a recombinant rotavirus defective for NSP6.

These constructs were used in reverse genetics experiments to provide exogenous segments 11R-*AatII* or 11R- Δ NSP6 to the helper rotavirus strain RF. Reverse genetics experiments using either pRiboz11R-*AatII* or pRiboz11R- Δ NSP6 plasmids resulted in RT-PCR detection of segment 11R in the viral progeny produced in MA-104 cells at passage 6 (Fig. 4a). RT-PCR signals were specific to 11R-*AatII* and 11R- Δ NSP6 RNAs and not to residual plasmid DNA, as no amplification was observed when the reverse transcriptase was omitted in the reaction (Fig. 4a, lanes RT-). For each duplicate, the RT-PCR products had the same size as those obtained from the rearranged segment 11 of virus M4 (386 bp) (Fig. 4a, lanes RT+). For the viral progeny generated from transfection of the control pRiboz plasmid, RT-PCR was negative, indicating the absence of rearranged sequence. RT-PCR products obtained from 11R-*AatII* and 11R- Δ NSP6 RNAs were digested by *AatII* and *HpaI*, respectively (Fig. 4b), indicating that the rearranged 11R RNA detected in the viral progeny was derived from the exogenous sequence. Moreover, the RT-PCR products contained the changes introduced by site-directed mutagenesis in the 11R-*AatII* and 11R- Δ NSP6 segments (Fig. S1

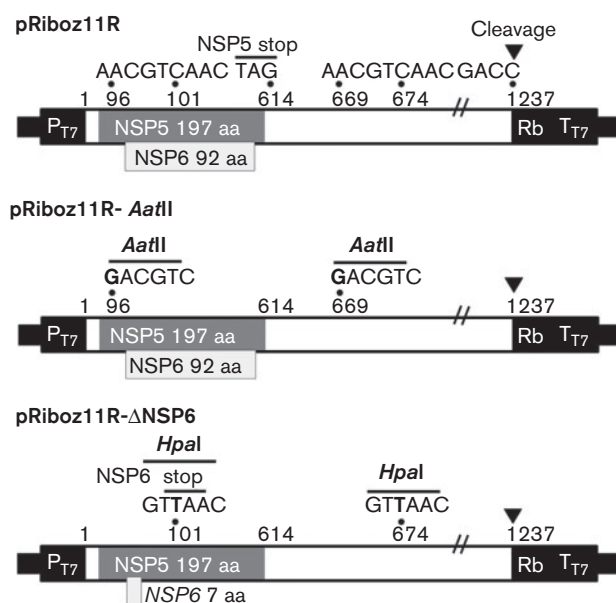


Fig. 3. Schematic representation of pRiboz plasmids containing segment 11R cDNAs. Both pRiboz11R-*AatII* and pRiboz11R- Δ NSP6 constructs were derived from pRiboz 11R and contained a full-length (614/42-614) segment 11R cDNA flanked by the T7pol promoter (P_{T7}) and the hepatitis delta virus ribozyme (Rb), followed by the T7pol terminator (T_{T7}). Arrowheads indicate the ribozyme self-cleavage site. Numbers indicate the nucleotide position in the rearranged segment and open boxes indicate the non-coding sequences. Dark grey and light grey shaded boxes indicate the NSP5 and NSP6 ORFs, respectively. The indicated restriction sites *AatII* (nt 96 and 669) and *HpaI* (nt 101 and 674) introduced by site-directed mutagenesis into the 11R sequence of, respectively, pRiboz11R-*AatII* and pRiboz11R- Δ NSP6, are indicated. The point mutation generating the *HpaI* restriction site also created an early stop codon into the NSP6 ORF.

available in the online Supplementary Material). During further passages (7–17), detection of RT-PCR products harbouring identical characteristics was maintained in the viral progeny of 11R-*AatII* and 11R- Δ NSP6 duplicates (data not shown).

RNA profiles of viruses obtained after reverse genetics experiments were visualized by PAGE every three passages (Fig. 5). After transfection of the control pRiboz plasmid, the viral RNA profile from passages 3 to 16 matched the WT RF virus profile. Surprisingly, although segment 11R was clearly detected by RT-PCR, no clear changes were observed on the RNA profiles of the 11R-*AatII* and 11R- Δ NSP6 viral progeny. The WT segment 11 was still visible at its usual position and only faint and hazy additional bands were present at different positions. Taken together, these results indicated that any recombinant viruses were kept to a minority among the viral populations obtained at passage 16. In order to isolate potential recombinant viruses, viral progeny were cloned by two plaque-to-plaque purifications and clones were further analysed by RT-PCR.

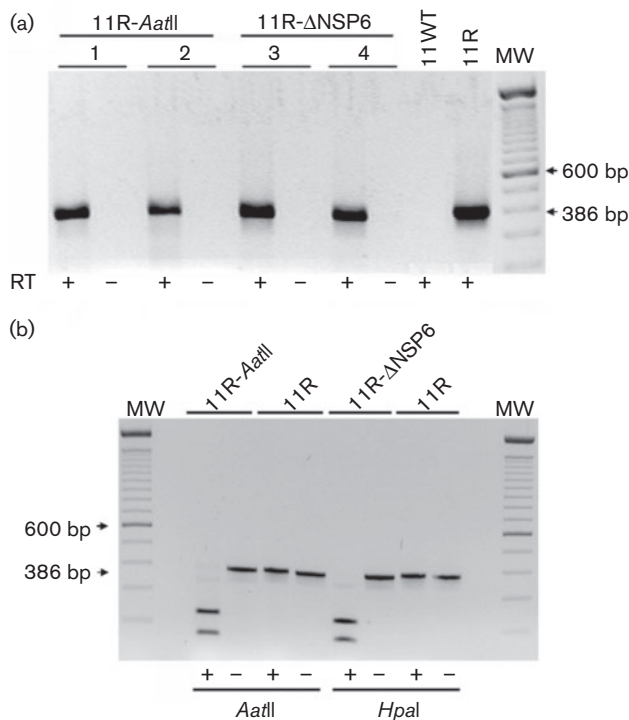


Fig. 4. Detection of 11R segments in viral progeny generated from transfection of pRiboz plasmids containing 11R segments. (a) RT-PCR detection of 11R segments in viral progeny obtained at the sixth MA-104 cell passage after transfection of pRiboz11R-AatII (lanes 1 and 2) or pRiboz11R-ΔNSP6 (lanes 3 and 4). RT-PCR amplification of viral RNAs performed with (+) or without (-) RT. The RT-PCR assay specifically detected the rearranged segment 11 of virus M4 (lane 11R) but not the WT segment 11 of virus RF (lane 11WT). In both progeny (11R-AatII or 11R-ΔNSP6), a 386 bp RT-PCR product corresponded to the expected size for the rearranged segment 11R. (b) Restriction profile of the 386 bp RT-PCR products obtained from 11R, 11R-AatII and 11R-ΔNSP6, digested (+) or not (-) by the restriction enzyme AatII or HpaI. Cleavage of the 11R-AatII and 11R-ΔNSP6 RT-PCR products showed that they respectively contained the restriction sites AatII and HpaI introduced by site-directed mutagenesis in the 11R sequence (no site, no cleavage). MW, 100 bp molecular mass ladder.

For 11R-ΔNSP6 progeny, 20 % of clones had a positive RT-PCR signal after the first cloning step. However, for all these clones, the RT-PCR signal was lost after the second cloning step, indicating that no viral clones contained the exogenous rearranged 11R-ΔNSP6 segment. As viruses with the segment 11R-ΔNSP6 have defective NSP6 protein, these results suggested that such viruses are unable to replicate without the help of WT virus, hampering the purification of recombinant clones. It is still unclear whether NSP6 is required for *in vitro* rotavirus replication, although some gene 11 forms lacking the initiation codon for NSP6 ORF have been described in field isolates of rotavirus (González & Burrone, 1989; Gorziglia *et al.*, 1989; Kojima *et al.*, 1996; Torres-Vega *et al.*, 2000).

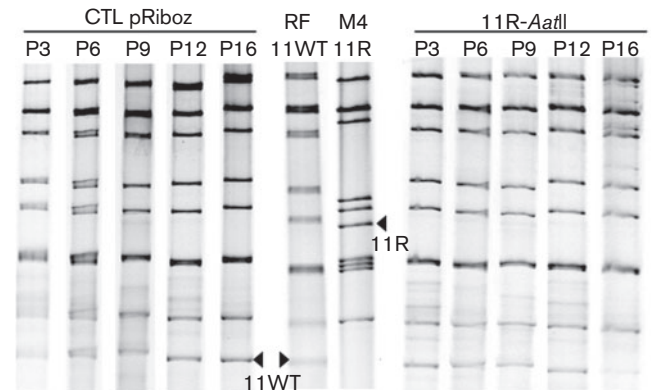


Fig. 5. RNA profiles of viral progeny obtained after transfection of the pRiboz11R-AatII plasmid. The RNA profiles of viral progeny obtained for the empty pRiboz control plasmid (CTL pRiboz) and the pRiboz 11R-AatII plasmid (11R-AatII) are respectively shown on the left and right side of the figure. Electropherotypes shown in the different lanes were produced from different PAGE experiments. P, passage number in MA-104 cell culture; RF 11WT, helper rotavirus strain RF containing a WT segment 11; M4 11R, rotavirus strain M4 containing a rearranged segment 11. Filled arrowheads indicate the localization of WT or segment 11R. The RNA profile of the pRiboz 11R-AatII viral progeny at cell passages 3–16 contained no visible band migrating at the expected size of segment 11R.

For 11R-AatII progeny, 30 % of clones were positive in RT-PCR assays after the first cloning step. For one clone, 100 % of the subclones tested after the second cloning step were positive by RT-PCR. All the PCR products were cleaved after AatII digestion, indicating that the exogenous rearranged segment 11R-AatII was maintained in the clonal viral population (Fig. S2). When these clones (named Cl 11R-2) were analysed by PAGE, the WT segment 11 was missing and was replaced by a segment approximately 1200 bp larger (Fig. 6a). This 1800 bp RNA segment, named 11R-2, was purified after electrophoresis on an agarose gel and further characterized.

The 386 bp RT-PCR product obtained from the purified 11R-2 dsRNA segment was the same size as those obtained from the 11R-AatII segment, and contained the AatII restriction site (Fig. 6b, c). Moreover, sequence analysis of the 386 bp RT-PCR product indicated that the 11R-2 sequence was identical to the 11R-AatII sequence and distinct from the sequence of WT bovine segment 11. These observations showed that the 11R-2 segment was derived from the exogenous segment 11R-AatII and not from spontaneous rearrangement of WT segment 11.

In order to obtain the complete sequence of the 11R-2 segment, a full-length amplification strategy was used, but this always resulted in PCR products smaller than the expected size (data not shown). This could be due to an intermolecular base pairing between the duplicated sequences of the rearranged gene, leading to mispriming

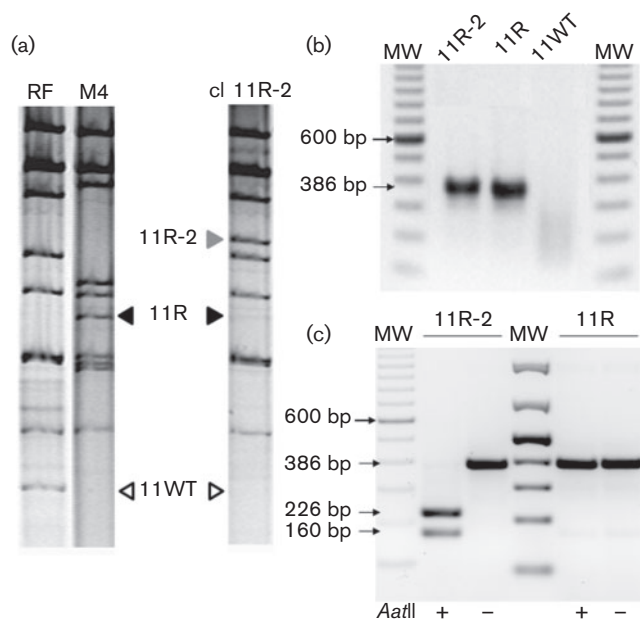


Fig. 6. Analysis of the viral clone 11R-2. (a) RNA profile of clone 11R-2 isolated from the viral progeny obtained after transfection of pRiboz-11R-AatII plasmid. Clone 11R-2 (cl 11R-2) contained a large-sized segment (11R-2) replacing the WT segment 11. RNA profiles of rotavirus RF (11WT) and M4 (11R) are shown for comparison. Open, closed and shaded arrowheads, respectively, indicate the localization of the 11WT, 11R and 11R-2 segments. (b) RT-PCR specific for rearranged segment 11 performed on the 11R-2 segment purified by agarose gel electrophoresis. RT-PCR products obtained from 11R-2 and 11R templates have a similar size (386 bp). No PCR product was obtained from the 11WT template. (c) Restriction profile of the 386 bp RT-PCR products obtained from 11R-2 and 11R, digested (+) or not (-) by the restriction enzyme *AatII*. Cleavage of the 11R-2 RT-PCR product showed that it contained the restriction site *AatII* introduced by site-directed mutagenesis in the 11R sequence (no site, no cleavage). MW, 100 bp molecular mass ladder.

and incorrect elongation during the RT-PCR, as described for other rearranged genes (Ballard *et al.*, 1992; Gault *et al.*, 2001). Further attempts were made to amplify the 11R-2 segment using several sets of primer pairs derived from the sequence of the 11R segment. As the sets of primer pairs theoretically covered the complete sequence of 11R-2 segment, it was expected that some PCR products generated from the 11R-2 template (approx. 1800 bp) should differ in size and/or sequence from those obtained from the 11R segment (1237 bp). Unexpectedly, when the 11R-2 or the 11R templates were amplified with the same combination of primers, the resulting PCR products were identical in size and sequence, irrespective of primer pairs tested. This strongly suggested that the 11R-2 segment was derived from the exogenous 11R segment by a duplication of the 11R rearrangement, leading to a sequence triplication (Fig. 7). If the 11R-2 segment had contained other

sequences and/or different rearrangements, at least some of the PCR products obtained from 11R-2 and 11R templates must have been different in size or sequence. Additionally, the viral clone 11R-2 was genetically stable after two passages in MA-104 cell culture and grew to titres similar to virus RF. Plaques obtained with 11R-2 and RF viruses were not significantly different in size. The NSP5 protein expressed by the 11R-2 virus was similar in size to the WT NSP5 protein, as judged by Western blot experiments, indicating that the NSP5 ORF of segment 11R-2 was unchanged (Fig. S3).

Taken together, these results showed that the reverse genetics assay permitted the recovery of recombinant viruses that had incorporated an exogenous RNA segment. However, the exogenous rearranged segment had been further rearranged. Whether this secondary rearrangement occurred at an early or late step of the reverse genetics system during high-m.o.i. passages remains to be established but is clearly a limitation of the system.

To conclude, the absence of a complete reverse genetics system restrains advances in our understanding of the rotavirus replication cycle and its molecular pathogenesis. Recently, it has been shown that transfection of the 11 rotavirus segments (as cDNA or ssRNA transcripts) is not sufficient for rescuing infectious virus (Richards *et al.*, 2013), contrary to what is reported for orthoreoviruses (Kobayashi *et al.*, 2007, 2010) and orbiviruses (Boyce *et al.*, 2008; Matsuo & Roy, 2009). Reverse genetics systems for rotavirus are currently established and applicable only for gene 4 (Komoto *et al.*, 2006, 2008), gene 8 (Navarro *et al.*, 2013; Trask *et al.*, 2010) and gene 7 (Troupin *et al.*, 2010). The aim of this study was to expand the reverse genetics system established for gene 7 to two other genes; genes 5 and 11. This system was based on the property of rearranged

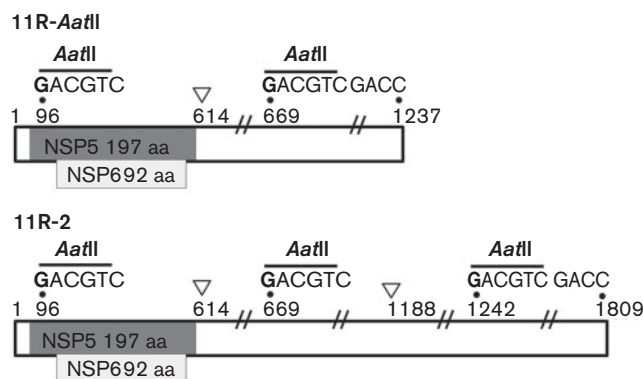


Fig. 7. Putative representation of the 11R-2 segment. Numbers indicate the nucleotide position in the rearranged segments and open boxes indicate the 5' and 3' UTR. Dark grey and light grey shaded boxes indicate the NSP5 and NSP6 ORFs, respectively. *AatII* restriction sites are shown at positions 96 and 669 for 11R-AatII, and at putative positions 96, 669 and 1242 for 11R-2. The arrowheads indicate the nucleotides involved in the rearrangement.

segments to be preferentially encapsidated (Troupin *et al.*, 2011).

Unexpectedly, when using segments 5R or 11R as exogenous segments, the reverse genetics assays led to the generation of spontaneous rearrangements, either of WT segments of the helper virus or of the exogenous segment itself. Nevertheless, exogenous sequences were found in the viral progeny obtained with segment 11R-*AatII* cDNA. However, the original 11R-*AatII* segment was further rearranged during the MA-104 cell passage. These observations suggested that segments 5R and 11R in the reverse genetics system might disturb either the viral RNA transcription or replication process during passages in cell culture, which is not the case for segment 7R (used as a control). The ability of segments 5 and 11 to rearrange is reported frequently in the literature, with several forms of different rearrangements (Bányai *et al.*, 2009; Bellinzoni *et al.*, 1987; Cao *et al.*, 2008; Gault *et al.*, 2001; Giambiagi *et al.*, 1994; González & Burrone, 1989; Gorziglia *et al.*, 1989; Hundley *et al.*, 1985; Kojima *et al.*, 1996, 2000; Matsui *et al.*, 1990; Matthijssens *et al.*, 2006; Mattion *et al.*, 1988, 1990; Méndez *et al.*, 1992; Nakagomi *et al.*, 1999; Oishi *et al.*, 1991; Palombo *et al.*, 1998; Patton *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 1988; Schnepf *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 1989; Taniguchi *et al.*, 1996; Thouless *et al.*, 1986; Tian *et al.*, 1993; Westerman *et al.*, 2006). Our results support the hypothesis that a small number of rearranged forms of these segments, produced during a replication cycle, might lead to disturbance of the transcription/replication machinery during further replication cycles. The dysfunction of the RNA-dependent RNA polymerase VP1 results in the production of rearranged segments. Thus, viruses with rearranged segments will be selected in the viral progeny over further multiplication cycles.

The implementation of a reverse genetics system for rotavirus remains a challenge. The spontaneous rearrangements observed during this study represent a major impediment to the broad use of a reverse genetics system based on the use of rearranged segments. Other strategies should be considered instead. As transfection of the 11 segments of rotavirus did not rescue recombinant virus (Richards *et al.*, 2013), it might be necessary to provide viral protein in addition to viral RNA.

METHODS

Viruses and cells. Human rotavirus M4 is a previously described cell culture-adapted virus, derived from a human rotavirus isolated from the stool of a chronically infected child with severe combined immunodeficiency syndrome. Virus M4 contains an 11R segment, 614/42-614 (GenBank accession no. AF338245) (Gault *et al.*, 2001). The same clonal stock of bovine rotavirus strain RF was used in all experiments. Rotavirus C1.17 (GenBank accession no. KJ532803) and rotavirus C2.22 (GenBank accession no. KJ532804) are two viral clones derived from the bovine rotavirus RF. Both viruses have a 5R segment. Rearrangements of segment 5 were generated *in vitro* by serial MA-104 cell culture passages at high m.o.i. of virus RF. Viral clones C1.17 and C2.22 with a segment 5R were isolated by plaque

purification at passage 16 and 20, respectively (C. Troupin, unpublished results). C1.17 virus contains a segment 5R with a sequence duplication starting at nt 1455 and reinitiating at nt 176 (1455/176-1455) and C2.22 contains a segment 5R with a 1526/84-1526 rearrangement.

Rotavirus propagation on confluent monolayers of MA-104 cells and plaque assays for rotavirus isolation and titration were performed as described previously (Gault *et al.*, 2001; Troupin *et al.*, 2010). COS-7 cells were used for DNA transfection and rotavirus infection. Recombinant vaccinia virus rDIs-T7pol, kindly provided by K. Ishii (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan) and expressing polymerase T7 (T7pol) (Ishii *et al.*, 2002), was produced in the DF1 chicken embryonic fibroblast cell line, kindly provided by N. Naffakh (Pasteur Institute, Paris, France). The resulting vaccinia virus stock was titrated on COS-7 cells by a fluorescent-focus assay. The MA-104, COS-7 and DF1 cell lines were cultured in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) supplemented with 10 % FCS, 2 mM glutamine, 100 U penicillin ml⁻¹ and 1 µg streptomycin ml⁻¹.

Plasmid constructs. Maps of the pRiboZ plasmids are shown in Figs 1 and 3. pRiboZ is a pBluescript II SK-derived plasmid containing the sequence of the T7pol promoter (P_{T7}) and the hepatitis delta virus (HDV) ribozyme, followed by the T7pol terminator (T_{T7}).

cDNAs for the 11R segment were obtained from virus strain M4, whilst the two 5R segments came from C1.17 and C2.22 viruses. The dsRNAs were reverse transcribed as described previously (Schnepf *et al.*, 2008), and PCR amplifications were performed using 5 µl cDNA in a 50 µl reaction mixture containing 1 × *Pfx* buffer, 1 × *Pfx* enhancer, 1 mM MgSO₄, 0.3 mM each dNTP, 0.3 µM each primer and 2.5 U *Pfx* DNA polymerase (Life Technologies) in a Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler, under PCR conditions described previously (Troupin *et al.*, 2010). Amplified cDNAs were digested and ligated into pRiboZ downstream of the P_{T7}. The generated plasmids, pRiboZ11R, pRiboZ5RC1.17 and pRiboZ5RC2.22, contained the authentic full-length cDNAs of the 11R or 5R segment flanked by P_{T7} and the HDV ribozyme, followed by T_{T7}. A QuikChange Multi Site-directed Mutagenesis kit (Stratagene) was used according to the manufacturer's instructions to introduce nucleotide changes into the sequences of pRiboZ11R, pRiboZ5R-C1.17 and pRiboZ5R-C2.22. The primers used for site-directed mutagenesis are given in Table 1. Mutagenesis created sites for the restriction enzyme *AatII* (pRiboZ11R-*AatII*) or *HpaI* (pRiboZ 11R-ΔNSP6) in 11R and for *MscI* in both 5R sequences (pRiboZ5R-C1.17 and pRiboZ5R-C2.22). To investigate whether the size of the duplication might influence the encapsidation of the rearranged segment, the cDNA of WT segment 5 was used to create three artificial rearrangements: 1515/1-1515 (pRiboZ5R-1), 1515/310-1515 (pRiboZ5R-310) and 1515/900-1515 (pRiboZ5R-900). Rearrangements 5R-310 and 5R-900 are close to rearrangements described in the literature (Patton *et al.*, 2001). The resulting plasmids were mutated to introduce the *MscI* restriction site, using the QuikChange Multi Site-directed Mutagenesis kit. Additionally, the first nucleotide of the ATG initiation codon was deleted to create a defective ΔNSP1 derivative for each of the five plasmids containing a segment 5R (pRiboZ5R-C1.17-ΔNSP1, pRiboZ5R-C2.22-ΔNSP1, pRiboZ5R-1-ΔNSP1, pRiboZ5R-310-ΔNSP1 and pRiboZ5R-900-ΔNSP1). All plasmid constructs were checked by DNA sequencing as described below. An empty pRiboZ plasmid and a pRiboZ plasmid containing the GFP gene downstream of the P_{T7} (pRiboZGFP) were used as controls.

Reverse genetics system. The pRiboZ constructs were transfected into confluent COS-7 cell monolayers in six-well plates, using 3 µl TransIT-LT1 transfection reagent (Mirus) (µg plasmid DNA)⁻¹, according to the manufacturer's instructions. Under the same conditions, the percentage of COS-7 cells transfected with the control plasmid pGFP-C1 was repeatedly approximately 90 %. Sixteen hours after transfection, the COS-7 cells were infected by recombinant

Table 1. Primers used for site-directed mutagenesis and RT-PCR

Primers*	Nucleotide sequence (5'→3') (restriction enzyme)†	Use
11R- <i>AatII</i> -f	TTTAAAAATGAATCGTCTTCTAC <u>GACGTCA</u> ACTCTTTCTGGAAAATC (<i>AatII</i>)	Site-directed mutagenesis Creation of <i>AatII</i> site in segment 11R
NSP6-stop-f	AAATGAATCGTCTTCTACAAC <u>GTTAACT</u> CTTTCTGGAAAATCTATTG (<i>HpaI</i>)	Creation of <i>HpaI</i> site in segment 11R
RF05- <i>MscI</i> -f	GATGTTGAGTAAATAT <u>GGCCACA</u> CTACGCCAGCACA (<i>MscI</i>)	Creation of <i>MscI</i> site in segments 5R
RF05-dATG-f	AAAAGTCTTGTGTGAGCCTGGCGACTTTTAAAGACG	Deletion of initiation codon in segments 5R Specific detection of rearranged segment 11
AS1nest11R-r	ACTAACATTAATACCTTTAGTTAAGGAG	RT
S11RA-f	TGAAGGTCGTGATTGTGTTGATGA	PCR
AS11RD-r	CAGATAGTGATGACGGTAAATGTA	PCR Specific detection of rearranged segments 5
RF05R-AS1-r	CGCCATGGCTCACACAAGA	RT and PCR (5R-1)
RF05R-AS2-r	CCTACACTTACGCTGCTTCACA	RT and PCR (5R-310, 5R-C1.17, 5R-C2.22)
RF05R-AS3-r	TCCTAAGTCTAAAGTCTTCCACAC	RT and PCR (5R-900)
RF05R-S1-f	GAGGGGACTAGTCATGCAAAAACA	PCR (all segments 5R)

*f, Forward; r, reverse.

†Restriction enzyme sites are underlined and nucleotides substituted are indicated in bold.

vaccinia virus rDIs-T7pol at an m.o.i. of 3. After a 2 h culture in DMEM supplemented with 2.5 % FCS, cells were washed three times with DMEM containing 0.25 µg porcine pancreatic trypsin type IX-S (Sigma) ml⁻¹ and were infected by the helper virus bovine rotavirus RF at an m.o.i. of 30. After 24 h of culture, COS-7 cells were harvested, freeze-thawed three times and centrifuged at low speed to remove cell debris. To rescue recombinant RF viruses, supernatants containing the viral progeny produced in COS-7 cells were propagated in MA-104 cells. At the first passage, confluent monolayers of MA-104 cells were inoculated with the supernatant corresponding to one well of COS-7 cells. For further serial passage in MA-104 cell culture, 1/10 of the undiluted MA-104 cell lysate was used to infect MA-104 cells in 25 cm² flasks for 48 h, and at each passage, aliquots were kept frozen at -80 °C for further analysis. Cell lysates were serially passaged 9 and 17 times for experiments with pRiboz-5R and pRiboz-11R plasmids, respectively. Attempts to rescue recombinant RF viruses carrying an exogenous rearranged segment were performed by two plaque-to-plaque cloning steps in MA-104 cells, as described previously (Gault *et al.*, 2001). All reverse genetics experiments were run in duplicate by separately testing, in MA-104 cells, the viral progeny produced from two independent wells of COS-7 cells. Similar results were obtained for both duplicates. The efficiency of transfection and viral infection of COS-7 cells during the first step of the reverse genetics system was assessed at 24 h post-infection. The percentage of COS-7 cells transfected by the pRibozGFP plasmid and co-infected by vaccinia virus and RF rotavirus was evaluated by detecting direct fluorescence of GFP (as expression of the GFP was driven by the T7pol of vaccinia virus) together with a rotavirus VP6-specific mouse mAb (clone RV133; kindly provided by Jean Cohen, CNRS 3296, Gif sur Yvette, France) coupled to a Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch). This assay showed that approximately 25 % of COS-7 cells were transfected and co-infected by vaccinia virus and RF rotavirus.

Nucleic acid analysis and sequencing. For PAGE and RT-PCR analysis, rotavirus genomic dsRNA was extracted every three passages from cell-culture aliquots using Tri-Reagent LS (Euromedex) according to manufacturer's recommendations. RNA genomic profiles were determined by PAGE in 14 % polyacrylamide gels for 16 h at 200 V at room temperature, followed by staining with GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium). The RT-PCR assay for specific detection of segments 5R and 11R in the viral progeny was performed with a Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler as described previously (Schnepf *et al.*, 2008; Troupin *et al.*, 2010, 2011). Primers used for RT-PCR detection of segments 5R and 11R are given in Table 1. The RT-PCR assay had a sensitivity threshold ratio of one segment 5R or 11R to 10⁴ WT segments 5 or 11. PCR products, undigested or digested with *AatII*, *HpaI* or *MscI* as appropriate, were separated in 1.5 % agarose gels stained with GelRed Nucleic Acid Gel Stain. DNA sequencing of plasmid constructs, cDNAs and RT-PCR products was performed according to the dideoxynucleotide chain-termination method, using an ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit and an ABI Prism 3130 XL Automatic Sequencer (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions.

Figure processing. Figures were assembled using Adobe Photoshop (version 8.0.1 for Mac OS X.10). For clarity, positive white-on-black pictures of GelRed-stained gels were converted to negative ones, with the invert function applied to the whole picture.

ACKNOWLEDGEMENTS

S. D., C. T. and L. V. T. were supported by a PhD fellowship from the 'Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur'.

REFERENCES

- Alam, M. M., Kobayashi, N., Ishino, M., Nagashima, S., Paul, S. K., Chawla-Sarkar, M., Krishnan, T. & Naik, T. N. (2008). Identical rearrangement of NSP3 genes found in three independently isolated virus clones derived from mixed infection and multiple passages of rotaviruses. *Arch Virol* **153**, 555–559.
- Ballard, A., McCrae, M. A. & Desselberger, U. (1992). Nucleotide sequences of normal and rearranged RNA segments 10 of human rotaviruses. *J Gen Virol* **73**, 633–638.
- Bányai, K., Bogdán, A., Domonkos, G., Kisfali, P., Molnár, P., Tóth, A., Melegh, B., Martella, V., Gentsch, J. R. & Szucs, G. (2009). Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003–2006, Hungary. *J Med Virol* **81**, 362–370.
- Bellinzoni, R., Mattion, N., Vallejos, L., La Torre, J. L. & Scodeller, E. A. (1987). Atypical rotavirus in chickens in Argentina. *Res Vet Sci* **43**, 130–131.
- Boyce, M., Celma, C. C. & Roy, P. (2008). Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts. *J Virol* **82**, 8339–8348.
- Cao, D., Barro, M. & Hoshino, Y. (2008). Porcine rotavirus bearing an aberrant gene stemming from an intergenic recombination of the NSP2 and NSP5 genes is defective and interfering. *J Virol* **82**, 6073–6077.
- Desselberger, U. (1996). Genome rearrangements of rotaviruses. *Adv Virus Res* **46**, 69–95.
- Estes, M. & Kapikian, A. (2007). Rotavirus. In *Fields Virology*, 5th edn, pp. 1917–1974. Edited by D. M. Knipe, P. M. Howley, R. A. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman & S. Straus. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Gault, E., Schnepf, N., Poncet, D., Servant, A., Teran, S. & Garbarg-Chenon, A. (2001). A human rotavirus with rearranged genes 7 and 11 encodes a modified NSP3 protein and suggests an additional mechanism for gene rearrangement. *J Virol* **75**, 7305–7314.
- Giambiagi, S., González Rodríguez, I., Gómez, J. & Burrone, O. (1994). A rearranged genomic segment 11 is common to different human rotaviruses. *Arch Virol* **136**, 415–421.
- González, S. A. & Burrone, O. R. (1989). Porcine OSU rotavirus segment II sequence shows common features with the viral gene of human origin. *Nucleic Acids Res* **17**, 6402.
- Gorziglia, M., Nishikawa, K. & Fukuhara, N. (1989). Evidence of duplication and deletion in super short segment 11 of rabbit rotavirus Alabama strain. *Virology* **170**, 587–590.
- Hundley, F., Biryahwaho, B., Gow, M. & Desselberger, U. (1985). Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. *Virology* **143**, 88–103.
- Hundley, F., McIntyre, M., Clark, B., Beards, G., Wood, D., Chrystie, I. & Desselberger, U. (1987). Heterogeneity of genome rearrangements in rotaviruses isolated from a chronically infected immunodeficient child. *J Virol* **61**, 3365–3372.
- Ishii, K., Ueda, Y., Matsuo, K., Matsuura, Y., Kitamura, T., Kato, K., Izumi, Y., Someya, K., Ohsu, T. & other authors (2002). Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: application as a new replication-deficient viral vector. *Virology* **302**, 433–444.
- Kobayashi, T., Antar, A. A., Boehme, K. W., Danthi, P., Eby, E. A., Guglielmi, K. M., Holm, G. H., Johnson, E. M., Maginnis, M. S. & other authors (2007). A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. *Cell Host Microbe* **1**, 147–157.
- Kobayashi, T., Ooms, L. S., Ikizler, M., Chappell, J. D. & Dermody, T. S. (2010). An improved reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses. *Virology* **398**, 194–200.
- Kojima, K., Taniguchi, K., Urasawa, T. & Urasawa, S. (1996). Sequence analysis of normal and rearranged NSP5 genes from human rotavirus strains isolated in nature: implications for the occurrence of the rearrangement at the step of plus strand synthesis. *Virology* **224**, 446–452.
- Kojima, K., Taniguchi, K., Kawagishi-Kobayashi, M., Matsuno, S. & Urasawa, S. (2000). Rearrangement generated in double genes, NSP1 and NSP3, of viable progenies from a human rotavirus strain. *Virus Res* **67**, 163–171.
- Komoto, S., Sasaki, J. & Taniguchi, K. (2006). Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4646–4651.
- Komoto, S., Kugita, M., Sasaki, J. & Taniguchi, K. (2008). Generation of recombinant rotavirus with an antigenic mosaic of cross-reactive neutralization epitopes on VP4. *J Virol* **82**, 6753–6757.
- Matsui, S. M., Mackow, E. R., Matsuno, S., Paul, P. S. & Greenberg, H. B. (1990). Sequence analysis of gene 11 equivalents from “short” and “super short” strains of rotavirus. *J Virol* **64**, 120–124.
- Matsuo, E. & Roy, P. (2009). Bluetongue virus VP6 acts early in the replication cycle and can form the basis of chimeric virus formation. *J Virol* **83**, 8842–8848.
- Matthijnssens, J., Rahman, M., Martella, V., Xuelei, Y., De Vos, S., De Leener, K., Ciarlet, M., Buonavoglia, C. & Van Ranst, M. (2006). Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. *J Virol* **80**, 3801–3810.
- Mattion, N., González, S. A., Burrone, O., Bellinzoni, R., La Torre, J. L. & Scodeller, E. A. (1988). Rearrangement of genomic segment 11 in two swine rotavirus strains. *J Gen Virol* **69**, 695–698.
- Mattion, N. M., Bellinzoni, R. C., Blackhall, J. O., Estes, M. K., Gonzalez, S., La Torre, J. L. & Scodeller, E. A. (1990). Genome rearrangements in porcine rotaviruses: biochemical and biological comparisons between a supershort strain and its standard counterpart. *J Gen Virol* **71**, 355–362.
- Méndez, E., Arias, C. F. & López, S. (1992). Genomic rearrangements in human rotavirus strain Wa; analysis of rearranged RNA segment 7. *Arch Virol* **125**, 331–338.
- Nakagomi, T., Horie, Y., Koshimura, Y., Greenberg, H. B. & Nakagomi, O. (1999). Isolation of a human rotavirus strain with a super-short RNA pattern and a new P2 subtype. *J Clin Microbiol* **37**, 1213–1216.
- Navarro, A., Trask, S. D. & Patton, J. T. (2013). Generation of genetically stable recombinant rotaviruses containing novel genome rearrangements and heterologous sequences by reverse genetics. *J Virol* **87**, 6211–6220.
- Oishi, I., Kimura, T., Murakami, T., Haruki, K., Yamazaki, K., Seto, Y., Minekawa, Y. & Funamoto, H. (1991). Serial observations of chronic rotavirus infection in an immunodeficient child. *Microbiol Immunol* **35**, 953–961.
- Palombo, E. A., Bugg, H. C. & Bishop, R. F. (1998). Characterisation of rearranged NSP5 gene of a human rotavirus. *Acta Virol* **42**, 55–59.
- Patton, J. T., Taraporewala, Z., Chen, D., Chizhikov, V., Jones, M., Elhelu, A., Collins, M., Kearney, K., Wagner, M. & other authors (2001). Effect of intragenic rearrangement and changes in the 3′ consensus sequence on NSP1 expression and rotavirus replication. *J Virol* **75**, 2076–2086.
- Paul, P. S., Lyoo, Y. S., Andrews, J. J. & Hill, H. T. (1988). Isolation of two new serotypes of porcine rotavirus from pigs with diarrhea. *Arch Virol* **100**, 139–143.
- Richards, J. E., Desselberger, U. & Lever, A. M. (2013). Experimental pathways towards developing a rotavirus reverse genetics system:

synthetic full length rotavirus ssRNAs are neither infectious nor translated in permissive cells. *PLoS ONE* **8**, e74328.

Schnepf, N., Deback, C., Dehee, A., Gault, E., Perez, N. & Garbarg-Chenon, A. (2008). Rearrangements of rotavirus genomic segment 11 are generated during acute infection of immunocompetent children and do not occur at random. *J Virol* **82**, 3689–3696.

Scott, G. E., Tarlow, O. & McCrae, M. A. (1989). Detailed structural analysis of a genome rearrangement in bovine rotavirus. *Virus Res* **14**, 119–127.

Taniguchi, K., Kojima, K. & Urasawa, S. (1996). Nondefective rotavirus mutants with an NSP1 gene which has a deletion of 500 nucleotides, including a cysteine-rich zinc finger motif-encoding region (nucleotides 156 to 248), or which has a nonsense codon at nucleotides 153–155. *J Virol* **70**, 4125–4130.

Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Steele, A. D., Duque, J., Parashar, U. D. & WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network (2012). 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **12**, 136–141.

Thouless, M. E., DiGiacomo, R. F. & Neuman, D. S. (1986). Isolation of two lapine rotaviruses: characterization of their subgroup, serotype and RNA electropherotypes. *Arch Virol* **89**, 161–170.

Tian, Y., Tarlow, O., Ballard, A., Desselberger, U. & McCrae, M. A. (1993). Genomic concatemerization/deletion in rotaviruses: a new mechanism for generating rapid genetic change of potential epidemiological importance. *J Virol* **67**, 6625–6632.

Torres-Vega, M. A., González, R. A., Duarte, M., Poncet, D., López, S. & Arias, C. F. (2000). The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J Gen Virol* **81**, 821–830.

Trask, S. D., Taraporewala, Z. F., Boehme, K. W., Dermody, T. S. & Patton, J. T. (2010). Dual selection mechanisms drive efficient single-gene reverse genetics for rotavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 18652–18657.

Troupin, C., Dehee, A., Schnuriger, A., Vende, P., Poncet, D. & Garbarg-Chenon, A. (2010). Rearranged genomic RNA segments offer a new approach to the reverse genetics of rotaviruses. *J Virol* **84**, 6711–6719.

Troupin, C., Schnuriger, A., Duponchel, S., Deback, C., Schnepf, N., Dehee, A. & Garbarg-Chenon, A. (2011). Rotavirus rearranged genomic RNA segments are preferentially packaged into viruses despite not conferring selective growth advantage to viruses. *PLoS ONE* **6**, e20080.

Westerman, L. E., Jiang, B., McClure, H. M., Snipes-Magaldi, L. J., Griffin, D. D., Shin, G., Gentsch, J. R. & Glass, R. I. (2006). Isolation and characterization of a new simian rotavirus, YK-1. *Virol J* **3**, 40.